

博士論文

滑膜肉腫に対する治療薬の探索
(Investigation of effective chemotherapy for
synovial sarcoma)

山崎 寛之

要旨

滑膜肉腫(synovial sarcoma)は、全軟部肉腫の約 10%(年間発症例数が人口 100 万人に対して 1-3 人)を占める悪性腫瘍で青年期(10-40 歳代)に多く発症する。この腫瘍は、18 番染色体上の *SS18*(synovial sarcoma translocation on chromosome 18)遺伝子と X 染色体上の *SSX*(synovial sarcoma X chromosome breakpoint)遺伝子の転座 t(X; 18)(p11.2; q11.2)によって *SS18-SSX* 融合遺伝子を生じ、この融合遺伝子が滑膜肉腫発症の引き金になっていることが示唆されている。滑膜肉腫は局所再発や転移に関して治療後も長期に渡り経過観察が必要な腫瘍であり、予後不良の腫瘍であるものの、希少腫瘍のため治療法の開発が進んでおらず、治療法が確立されていないのが現状である。現在、滑膜肉腫に対する化学療法として二本鎖 DNA 切断を誘起する AI (Adriamycin + Ifosfamide)療法が行われており、その奏効率は 50%未満と効果を示しているものの、滑膜肉腫と DNA 修復の関連性について調べた研究はこれまでにない。そこで私は、滑膜肉腫に対する新たな化学療法の確立を目的として、滑膜肉腫における二本鎖 DNA 修復活性の異常に関して解析を行った。その結果、滑膜肉腫細胞株では DNA 相同組換え修復の後半部分で働く一本鎖 DNA 上に結合した RPA32 と RAD51 が入れ替わることが出来ないことが原因となり、滑膜肉腫細胞株の DNA 相同組み換え修復活性が低下していることがわかった。そこで、DNA 相同組み換え修復不全細胞に対して特異的に増殖を抑える PARP 阻害剤(Olaparib)による滑膜肉腫細胞株の増殖抑制効果を検討したところ、滑膜肉腫細胞株は Olaparib に対して感受性を示した。さらにその効果はアルキル化剤である Temozolomide との併用により増強されることがわかった。これらの結果から、Olaparib と Temozolomide の併用が滑膜肉腫の治療に応用できる可能性が示唆された。

また、多発性骨髄腫に使用されている Bortezomib も滑膜肉腫細胞株の増殖抑制効果を示すことがわかった。Bortezomib を作用させた滑膜肉腫細胞株では、p21 の蓄積により Rb

タンパク質のリン酸化が阻害され、G1 期で細胞周期が止まることがわかった。これらの結果から、**Bortezomib** も滑膜肉腫の治療に応用できる可能性が示唆された。

目次

要旨

第1章 序論	1
1.1 滑膜肉腫	
1.2 SS18 および SSX	
1.3 滑膜肉腫に対する治療法	
第2章 実験材料と方法	5
2.1 細胞株	
2.2 プラスミド、siRNA および試薬	
2.3 トランスフェクション	
2.4 ウェスタンブロッティング	
2.5 免疫蛍光細胞染色	
2.6 放射線および DNA 損傷剤感受性試験	
2.7 プロテアソーム阻害剤感受性試験	
2.8 定量的 RT-PCR	
2.9 フローサイトメトリー	
2.10 DR-GFP レポーターアッセイ	
2.11 細胞遺伝学的解析	
2.12 マイクロアレイ	
2.13 統計学的解析	
第3章 結果	11
3.1.1. 滑膜肉腫細胞株は DNA 損傷剤に対して感受性を示す。	
3.1.2. 滑膜肉腫細胞株は DNA 相同組み換え修復の終期反応に異常がある。	
3.1.3. 滑膜肉腫細胞株は DNA 相同組み換え修復活性が低下している。	
3.1.4. PARP 阻害剤 Olaparib は滑膜肉腫細胞株の増殖抑制効果を示す。	
3.1.5. アルキル化剤 Temozolomide は Olaparib の滑膜肉腫細胞株の増殖抑制効果を増強する。	
3.2.1 滑膜肉腫細胞株はプロテアソーム阻害剤である Bortezomib に対して感受性を示す。	
3.2.2 Bortezomib は細胞周期を G1 期で止める。	
3.2.3 Bortezomib は p21 のタンパク質を増加させることで細胞周期を G1 期で止める。	
3.2.4 滑膜肉腫細胞株における E2F1 の発現減少は細胞増殖を抑制する。	

第4章 考察	20
4.1.1 滑膜肉腫細胞株は相同組み換え修復に異常がある。	
4.1.2 PARP 阻害剤 Olaparib とアルキル化剤 Temozolomide の併用は滑膜肉腫に対して有効な化学療法となりうる。	
4.2.1 プロテアソーム阻害剤 Bortezomib は滑膜肉腫細胞株に対して p21 の蓄積により細胞周期を止めることで増殖を抑制する。	
謝辞	23
参考文献	24
図表	31
Figure 1. SS18 遺伝子と SSX 遺伝子の染色体転座	
Table 1. Gene expression profiles: genes down-regulated by SS18-SSX1	
Figure 2. 融合遺伝子 SS18-SSX の滑膜肉腫発症における影響	
Table 2. Therapeutic Regimens (Table 1 in reference 31).	
Table 3. Results of Previous Studies (Table 2 in reference 31).	
Figure 3. 滑膜肉腫細胞株における DNA 損傷修復が低下している。	
Figure 4. DNA 相同組み換え修復経路	
Figure 5. 滑膜肉腫細胞株は DNA 相同組み換え修復の終期反応に異常がある。	
Figure 6. 滑膜肉腫細胞株は DNA 相同組み換え修復活性が低下している。	
Figure 7. PARP 阻害剤 Olaparib は滑膜肉腫細胞株の増殖抑制効果を示す。	
Figure 8. アルキル化剤 Temozolomide は Olaparib の滑膜肉腫細胞株の増殖抑制効果を増強する。	
Figure 9. 滑膜肉腫細胞株は Bortezomib に対して感受性を示す。	
Table 4. Gene expression profiles: genes up-regulated by Bortezomib	
Table 5. Gene expression profiles: genes down-regulated by Bortezomib	
Figure 10. Bortezomib は滑膜肉腫細胞株の細胞周期を G1 期で止める。	
Figure 11. Bortezomib は p21 のタンパク質量を増加させる。	
Figure 12. Bortezomib は Rb タンパク質のリン酸化を抑える。	
Figure 13. E2F は G1 期から S 期への移行を促進させる。	
Figure 14. Bortezomib は E2F の下流遺伝子の発現を抑制する。	
Figure 15. E2F1 の発現抑制は滑膜肉腫細胞株の増殖を抑える。	
Figure 16. 滑膜肉腫細胞株は多倍体を有している。	

第 1 章 序論

1.1 滑膜肉腫

滑膜肉腫は、全軟部肉腫の約 10%を占め、関節を主として上肢および下肢に発症する悪性の軟部肉腫である^{1,2}。年間発症例数が、人口 100 万人に対して 2,3 人と非常にまれではあるが、青年期(10-40 代)で発症することが多く、有効な化学療法が確立されていないことから局所再発や転移に関して治療後も長期に渡り経過観察が必要な腫瘍である。関節近傍でよく見られ、微視的な形状が関節を包んでいる滑膜と似ていたことから、「滑膜」肉腫と名前がつけられた。しかしその後、滑膜肉腫の免疫組織化学的特徴が、紡錘腫瘍細胞のバックグラウンドで腺上皮分化が見られる二相性を示すタイプのものおよび示さない単相性の 2 つのサブタイプが確認され、滑膜との類似性を示さないことから、現在では由来が不明な腫瘍として認識されている。また発症起源については、さまざまな報告があり、神経系³や筋芽細胞⁴、上皮系幹細胞⁵などがその由来の候補として指摘されている。

滑膜肉腫は、ほぼすべての症例において 18 番染色体上の *SS18* (synovial sarcoma translocation, chromosome 18) 遺伝子と X 染色体上の *SSX* (synovial sarcoma X chromosome breakpoint) 遺伝子の転座 t(X; 18)(p11.2; q11.2)が見られる⁶。滑膜肉腫に特徴的な分子マーカーが存在しないことから、この転座が見られるかどうかで確定診断となっている。これまでのところ、9 つある *SSX* ファミリーのうち *SSX1*, *2*, *4* の 3 種類が *SS18* と転座を起こしていることが確認されており、その内訳は *SS18-SSX1* が全体のおよそ 3 分の 2、*SS18-SSX2* が 3 分の 1、*SS18-SSX4* が 2%未満となっている²。また、症例数の男女比は報告ごとにばらつきがあり、男女比が 1.1 : 1 や 1 : 1.2 という割合が報告されている^{2,7}。滑膜肉腫は性染色体である X 染色体の転座が見られるものの、発症と男女差との関連ははっきりしていない。

滑膜肉腫の転座は、*SS18* の C 末端の 8 残基が *SSX* の C 末端の 111-188 残基に置き換わ

っている(Fig. 1)。この滑膜肉腫に特有な転座によって生じた SS18-SSX1 をラットの正常線維芽細胞に発現させると、足場非依存的に増殖し、ヌードマウスにおいて腫瘍形成を誘発することが報告されており、SS18-SSX1 は滑膜肉腫の発症において重要な役割を果たすことが示されている⁸。

1.2 SS18 および SSX

SS18-SSX の転座が滑膜肉腫において確認されたのとほぼ同じ時期に、転座前の SS18、SSX の cDNA の塩基配列が報告されている^{6,9}。SS18 は、ヒトの幅広い組織に普遍的に発現している 387 アミノ酸からなるタンパク質である。SS18 は、機能的なドメインを二つ持っており、どちらも転写制御に関わっていることが明らかとなっている。その一つは、N 末端の 20-73 残基に存在する SNH (SS18 N-terminal homology) ドメインであり、もう一つはグルタミン(Q)、プロリン(P)、グリシン(G)、チロシン(Y)リッチな QPGY ドメインである。SS18 は DNA 結合能を持たないものの、QPGY ドメインに DNA 結合ドメインを融合させると、レポーター遺伝子の発現を活性化させることから、SS18 は転写共役因子として働くことが示唆されている。また、SS18 はクロマチン構造変換因子 SWI/SNF 複合体のサブユニットである BRM および Brg1 と SNH ドメインを介して相互作用することで、レポーター遺伝子の転写を抑制することがわかっている¹⁰。さらに、SS18 は転写因子である AF10¹¹ や p300¹²、ヒストン脱アセチル化酵素のサブユニットである mSin3A¹³ と結合することが報告されており、SS18 をノックアウトしたマウス線維芽細胞の解析により SS18 が p300 の発現を誘導していることが示唆されている¹⁴。

一方、SSX は精巣および甲状腺にのみ発現の見られる 188 アミノ酸からなるタンパク質である。また、SSX は、細胞移動に寄与することが報告されており、腫瘍の転移能を担うのではないかと類推されている¹⁵。実際、様々なタイプの腫瘍で発現が見られ、SSX3 を除いて SSX1-5 は Cancer-Testis Antigens (CTA) の一つとして認識されている¹⁶。SSX には

二つの転写抑制ドメインが存在し、N末端に KRAB (Krüppel-associated box) および C末端に SSXRD (SSX repressor domain) があり、C末端の SSXRD は転座後の SS18-SSXにも存在している(Figure 1-1)。SS18と同様に DNA 結合能を持たないものの、どちらのドメインもレポーター遺伝子の転写を抑制している¹⁷。このように転写抑制因子として機能するためには、DNA に結合するタンパク質との相互作用が必要になるが、これまで SSX は、ポリコーム群タンパク質である Bmi1 や RING1 と共局在することが知られており¹⁸、またホメオボックス遺伝子である Lhx4 と結合し、Lhx4 のターゲット遺伝子の転写を抑制していることが明らかとなっている¹⁹。

上記で述べたように SS18、SSX ともに転写に関連する遺伝子であり、滑膜肉腫において転写異常が引き起こされていることが予想されてきた。実際、SS18-SSX によって転写異常が引き起こされるターゲット遺伝子を探索する研究は盛んに行われてきており、当研究室における遺伝子発現解析からも滑膜肉腫において発現抑制されている遺伝子がいくつか見出されている²⁰ (Table 1)。また、他のグループからも SS18-SSX のターゲット遺伝子として、滑膜肉腫の増殖および維持に必要な遺伝子に関する複数の報告がなされている²⁰⁻²⁸ (Fig. 2)。このように SS18-SSX は、滑膜肉腫の維持において必要不可欠な役割を担っているが、DNA 結合能を持たないことから、直接のターゲット遺伝子を特定したり、転写制御のメカニズムを解明したりすることは困難であった。だが、近年 SS18 はクロマチン構造変換因子 SWI/SNF (BAF)複合体の構成因子の一つであること、さらに、SS18-SSX は SWI/SNF (BAF)複合体と結合するが、SWI/SNF (BAF)複合体の構成因子の一つである BAF47 が複合体に入ることを阻害することが明らかとなった^{20, 29, 30}。

1.3 滑膜肉腫に対する治療法

一般的に軟部肉腫に対する治療法は手術による切除が原則であり、手術単独での切除縁の確保が難しい場合に化学療法や放射線治療の併用が検討される。滑膜肉腫は症例数が少

ないことから、軟部肉腫全体に対する臨床試験しか行われていない。そのため、以下で述べる奏効率や生存期間中央値は軟部肉腫全体に対する数値を示した。近年、切除困難な進行例を中心に化学療法の治療開発が進められており、1999年に European Organization for Clinical and Treatment of Cancer (EORTC)が軟部肉腫進行例に対する Adriamycin を含むアントラサイクリンを中心とした化学療法の 7 つの臨床試験 2,185 例についての後ろ向き解析結果を報告している³¹。その報告の中では、9 つのレジメンが用いられており、詳細は以下の通りである。Adriamycin 単剤、Adriamycin + Ifosfamide、Adriamycin + Ifosfamide + G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor)、Epirubicin 単剤、Epirubicin 単剤増量が 2 種類、Adriamycin + Dacarbazine + Cyclophosphamide + Vincristine (CYVADIC)の 4 週サイクル投与と 8 週サイクル投与、CYVADIC の増量 3 週サイクル投与となっている (Table 2)。生存期間中央値に関し、最も長かったレジメンは、Adriamycin + Ifosfamide 投与群の 58 週であり、最も短かったレジメンは Adriamycin 単剤投与群の 41 週であった (Table 3)。また、奏効率が最も高かったレジメンは、G-CSF を使用することにより Adriamycin + Ifosfamide による副作用として現れる好中球減少症を抑えることで、投与量を増加させたレジメンの奏効率が最も高く 46%となっており、最も低かったレジメンは CYVADIC の 8 週サイクル投与群の 15%であった (Table 3)。このエビデンスから AI 療法が滑膜肉腫に対する標準治療となっている。しかし、G-CSF を使用することによって奏効率は上昇するものの、生存期間中央値の延長は認められていないのが現状であり (AI 療法 + G-CSF の生存期間中央値は 54 週)、奏効率が高く生存期間の延長が認められる化学療法の開発が期待されている。

第 2 章 実験材料および方法

2.1 細胞株

滑膜肉腫由来細胞株である SYO-1 (from A. Kawai: National Cancer Center, Tokyo, Japan; SS18-SSX2 発現細胞)、YaFuSS (from J. Toguchida, Kyoto University; SS18-SSX1 発現細胞)および HS-SYII(from H. Sonobe: Kochi Medical School, Kochi, Japan; SS18-SSX1 発現細胞)は、DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) low glucose (Invitrogen) に 10% FBS (Fetal Bovine Serum) (Invitrogen)、1% Penicillin-Streptomycin (MP Biomedicals) を添加した培地を用いて培養した。

NBS1 欠損細胞株であるナイミーヘン症候群由来細胞株 GM07166VA7 および DR-GFP レポーターシステムを導入した GM07166VA7 (from K. Komatsu, Kyoto University, Kyoto, Japan)は、DMEM low glucose に 10% FBS、1% Penicillin-Streptomycin を添加した培地を用いて培養した。また、GM07166VA7 に *NBS1* 遺伝子を安定的に発現させた細胞株は当研究室において作成しており、DMEM low glucose に 10% FBS、1% Penicillin-Streptomycin、800 µg/ml G418 を添加した培地を用いて培養した。

ヒト子宮頸がん由来細胞株 HeLa (from ATCC: American Type Culture Collection)は、DMEM high glucose (Invitrogen) に 10% BS (Bovine Serum) (Invitrogen)、1% Penicillin-Streptomycin (MP Biomedicals) を添加した培地を用いて培養した。細胞は、すべて 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。

2.2 プラスミド、siRNA および試薬

pDRGFP および pCBASceI は addgene より購入した。siRNA (si-control, si-E2F1 [s4405, s4406]) はすべて Ambion から購入した。ここで用いた siRNA の標的配列を以下の通りである。

si-E2F1#1 (s4405) 5'- GTCACGCTATGAGACCTCA -3'

si-E2F1#2 (s4406) 5'- GGACCTTCGTAGCATTGCA -3'

Etoposide、Olaparib、Temozolomide および Bortezomib はそれぞれ和光純薬工業、JS Research Chemicals Trading、東京化成工業、Focus Biomolecules より購入した。

2.3 トランスフェクション

DR-GFP レポーターアッセイを行う際には、I-SceI を PEI-MAX reagent (Polysciences) を PEI:DNA を 3:1 (15 μ l:5 μ g)の割合で混ぜ、トランスフェクションを行った。

また、滑膜肉腫細胞株に対する siRNA のトランスフェクションには、Neon Transfection System (Life Technologies)を用い、以下の条件 (SYO-1 および YaFuSS: 1100 V, 40 ms, 1 pulse; HS-SYII: 1400 V, 20 ms, 1 pulse) でエレクトロポレーションを行い、任意の時間培養し、解析に用いた。

2.4 ウェスタンブロッティング

各タンパク質は RIPA buffer (10mM Tris-HCl [pH7.4], 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Triton-X, 1% DOC, 0.1% SDS)を用いて溶解した。SDS Sample buffer を 6分の1 量加え、95°C で 5 分間熱変性させ、SDS-PAGE により泳動を行った。泳動後、PVDF (polyvinylidene fluoride)膜 (Immobilon-P Transfer Membrane [Millipore])に転写を行い、blocking buffer (20 mM Tris-HCl [pH7.5], 150 mM NaCl, 5% スキムミルク) を用いて室温で 1 時間ブロッキングを行った。一次抗体を Rinse buffer (0.1 mM Tris-HCl [pH7.5], 10 mM EDTA, 1.5 M NaCl, 1% Tween20)で希釈し、4°C で一晩インキュベートした。一次抗体はそれぞれ以下の希釈率で用いた。anti-Halo ラビット抗体(1:1000; Promega)、anti-Flag マウス抗体 (1:3000; Sigma)、anti-BRCA1 ラビット抗体(1:10000; Millipore)、anti-Rad51 ラビット抗体(1:1000; Santa Cruz)、anti- β -Actin ヤギ抗体(1:1000; Santa Cruz)。一次抗体反応後、

Rinse buffer で 5 分間の wash を 3 回行い、二次抗体を Rinse buffer で希釈し、室温で 1 時間反応させた。二次抗体はそれぞれ以下のものを用いた。ECL Anti-Mouse IgG, HRP linked Whole antibody sheep (1:10000; GE healthcare)、ECL Anti-Rabbit IgG, HRP linked Whole antibody donkey (1:10000; GE healthcare)、donkey anti-goat IgG-HRP antibody (1:10000; Santa Cruz)。二次抗体反応後、Rinse buffer で 5 分間の wash を 3 回行い、Pierce Western Blotting Substrate Plus (Thermo)を用いて発光処理を行った。その発光を Chemidoc XRS (BioRad)を用いて検出した。

2.5 免疫蛍光細胞染色

前日にカバーガラス上にまいた細胞に 10 Gy の γ 線(コバルト 60 を線源として用いた)を照射し、37°C で 4 時間インキュベートし DNA の損傷部位に HR 修復因子を誘導したのちに、PBS で洗浄し、4%パラホルムアルデヒドを用いて氷上で 30 分間固定した。固定後、細胞を PBS で洗浄し、室温で 10 分間 0.1% TritonX-100 により細胞膜の透過処理を行い、blocking reagent (2% NSS [Normal Swine Serum], 0.05% TritonX-100)を用い室温で 30 分間インキュベートした。その後、blocking reagent で希釈した一次抗体を 4°C で一晩反応させた。一次抗体はそれぞれ以下の希釈率で用いた。anti- γ H2AX 抗体(1:250; Millipore)、anti-MRE11 抗体(1:200; abcam)、anti-pRPA32 抗体(1:250; Bethyl Laboratories)、anti-Rad51 抗体(1:300; Santa Cruz)。一次抗体を反応させたのち、PBST (0.05% TritonX-100 in PBS)で室温 5 分間の洗浄を 3 回行い、二次抗体を室温で 1 時間遮光し反応させた。二次抗体は、Alexa Fluor 抗体(1:1000; Molecular Probes)を用いた。二次抗体反応後 PBST による洗浄を 3 回行い、細胞核を染色するため、室温で 15 分間遮光し DAPI(2 μ g/mL)染色を行った。最後に PBST による洗浄後、退色防止剤を添加し封入した。観察には共焦点レーザー顕微鏡(LSM510; Carl Zeiss)を使用し、40 倍の対物水浸レンズを用いた。

2.6 放射線およびDNA損傷剤感受性試験

6 cm dish に細胞数が 3×10^2 個となるように各培養細胞を必要枚数分播いた。その翌日に、各細胞が dish に接着していることを顕微鏡で確認し、DMSO (Dimethyl sulfoxide) を用いて各濃度に希釈した薬剤 (Etoposide, Olaparib and Temozolomide) を含む培地と交換した。この際、全ての dish に等量の DMSO が含まれるように調製した。その後、10 日間培養を続け (3 日毎に Olaparib または DMSO を含む培地に交換)、コロニーカウントを行った。

また、放射線に対する感受性を測定する実験においても同様に、6 cm dish に細胞数が 3×10^2 個となるように各培養細胞を必要枚数分播き、翌日各細胞が dish に接着していることを顕微鏡で確認し、各強度の放射線を照射した。照射後 10 日間培養を続け (3 日毎に培地を交換)、コロニーカウントを行った。

2.7 プロテアソーム阻害剤感受性試験

24well プレートに 2×10^4 個 (HeLa および SYO-1)、 6×10^4 個 (YaFuSS および HS-SYII) となるように各培養細胞を播いた。その翌日に、各細胞が dish に接着していることを顕微鏡で確認し、DMSO を用いて各濃度に希釈した Bortezomib を含む培地と交換した。48 時間培養後、細胞を PBS で洗浄し、トリプシン処理を行いディッシュ上に張りついている細胞数をカウントし、DMSO コントロールの細胞数で標準化した。

2.8 定量的 RT-PCR

mRNA から cDNA を合成するため、Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用いた。定量的 RT-PCR 反応は Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) を使い、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied BioSystems) で PCR 反応、解析を行った。サンプル間の遺伝子発現量の差は $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて評価した。プライマーは以下のものを用いた。インターナルコントロールである B2M は 5'-

TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATC -3'および 5'- TCTCTGCTCCCCACCTCTAAG -3'、
E2F1 は 5'- ACGTGACGTGTCAGGACCTTCGTAGCATTG -3' および 5'-
GAGATGATGGTGGTGGTGACACTATGGTGG -3' 、 E2F2 は 5'-
CTTGTGATTGTATCCTGAGGTCCCAGAACC -3' および
5'-GCTCATAAAGACACGACCAGGCGAAACCAG -3' 、 Cyclin A2 は 5'-
CGCTCCAAGAGGACCAGGACAATATCAACC -3' および 5'-
GGTGACATGCTCATCATTACAGGAAGATC-3' 、 Cyclin E2 は 5'-
TCCTATGGAAGACAGACATAATATCCAGAC -3' および 5'-
TGTCATAATGCCTCCATTGCACACTGGTGA -3'を用いた。

2.9 フローサイトメトリー

細胞周期を調べるため、一定細胞数の細胞をまき、翌日各濃度に希釈した薬剤を含む培地に交換した。薬剤添加後 24 時間後に、細胞を回収し、PBS で洗浄し、氷冷 70%エタノールで一晩-20°C で固定を行った。固定後、細胞を PBS で洗浄し、200 µg/ml の RNase A を 37°C20 分間作用させ、RNA を除去した。その後、10 µg/ml propidium iodide (Sigma) を含んだフローサイトメトリーバッファーで DNA を染色し、EC800 (SONY)を用いてデータの取得および解析を行った。

2.10 DR-GFP レポーターアッセイ

DR-GFP 配列を一つだけゲノム中に含んだ GM07166VA7、GM07166VA7+NBS1 細胞は当研究室で以前に作成しており³²、DR-GFP 配列を一つだけゲノム中に持った SYO-1 および YaFuSS 細胞株はこれまでに報告された通りに作成した³³。すべての細胞株は、相同組み換え効率を測定するため pCBASceI を、またトランスフェクション効率を測定するため pEGFP-C1 をトランスフェクションした。トランスフェクション後 4 日間培養し、GFP 陽

性細胞をフローサイトメトリーにより測定した。相同組み換え効率は、pCBASceI をトランスフェクションした際の GFP 陽性率を pEGFP-C1 をトランスフェクションした際の GFP 陽性率で割ることによって求めた。

2.11 細胞遺伝学的解析

染色体スプレッドを行うため、増殖している SYO-1 細胞に対して 2 $\mu\text{g/ml}$ のコルセミドを 1 時間 45 分作用させ、75 mM KCl 水溶液により低張処理を行い氷冷酢酸メタノールにより固定を行った。その後、スライドガラス上に湿潤空気乾燥法で展開して染色体標本を作成した。作成した染色体標本を用いてギムザ染色を行った。観察には共焦点レーザー顕微鏡(LSM510; Carl Zeiss)を使用し、100 倍の対物油浸レンズを用いた。

2.12 マイクロアレイ

滑膜肉腫細胞株に対して Bortezomib を 16 nM、4 時間作用させたのちに RNA を回収した。その回収した total RNA を Low Input QuickAmp Labeling Kit (Agilent)を用いて cDNA の合成、cRNA のラベルと増幅を行った。Cyancine-3 ラベル化 cRNA を SurePrint G3 Human GE マイクロアレイキット 8x60K Ver2.0 (Agilent)および Agilent Microarray Scanner C を用いて発現量解析を行った。

2.13 統計学的解析

統計学的解析には両側 t 検定を行った。

第 3 章 結果

3.1.1. 滑膜肉腫細胞株は DNA 損傷剤に対して感受性を示す。

滑膜肉腫に対する治療として臨床で用いられている AI 療法(Adriamycin と Ifosfamide の併用療法)は、Adriamycin が二本鎖 DNA 切断を、そして Ifosfamide はアルキル化剤で DNA 一本鎖切断を引き起こす。これらの DNA 損傷によって最終的に二本鎖 DNA 切断を生じさせる古典的な抗がん剤である。この AI 療法は正常細胞に比べてがん細胞の細胞増殖が活発であることを利用したものであるため、滑膜肉腫に特化した治療法ではない。しかし、滑膜肉腫を含む軟部肉腫に対する化学療法のうち AI 療法の奏効率が 46% と最も高かった³¹ことから、私は滑膜肉腫において二本鎖 DNA 切断を修復する活性が低下しているのではないかと予想を立てた。二本鎖 DNA 切断を修復する経路は DNA homologous recombination repair (DNA 相同組み換え修復)と DNA non-homologous end joining repair (DNA 非相同末端結合修復)の 2 つの経路が存在する。当研究室において DNA 相同組み換え修復で働く NBS1 遺伝子が欠損した GM07166VA7 細胞(NBS1 遺伝子に変異が入り全長の NBS1 タンパク質が作ることができないナイミンヘン症候群の患者の皮膚から樹立された線維芽細胞 ; 以下、GM 細胞と表記)、および、GM07166VA7 細胞に正常 NBS1 遺伝子を恒常的に発現させ、DNA 相同組み換え修復が回復した細胞株 GM07166VA7-NBS1 細胞(以下、GM-NBS1 細胞と表記)を作製していた³²ため、この 2 つの細胞をコントロールとして、滑膜肉腫由来の 2 種類の培養細胞(SYO-1、YaFuSS)の二本鎖 DNA 切断を誘発する電離放射線に対する感受性をコロニーアッセイにより測定した。その結果、電離放射線による DNA 損傷に対して DNA 相同組み換え修復が回復した細胞株 GM-NBS1 細胞は抵抗性を示すのに対して、2 種類の滑膜肉腫細胞株(SYO-1、YaFuSS)は DNA 相同組み換え修復活性が低下した GM 細胞と同程度に感受性を示すことがわかった (Fig. 3A)。さらに、DNA Topoisomerase II の働きを阻害することによって二本鎖 DNA 切

断を誘導する抗がん剤 Etoposide に対する滑膜肉腫細胞株の感受性を調べたところ、電離放射線に対する感受性と同様に GM-NBS1 細胞は抵抗性を示すのに対して、2 種類の滑膜肉腫細胞株(SYO-1、YaFuSS)と GM 細胞は感受性を示すことがわかった(Fig. 3B)。これらの解析結果から、2 種類の滑膜肉腫細胞株(SYO-1、YaFuSS)は二本鎖切断 DNA を修復する活性が低下していることが判明した。

3.1.2. 滑膜肉腫細胞株は DNA 相同組み換え修復の終期反応に異常がある。

二本鎖 DNA 切断を誘発する電離放射線や Etoposide に対する 2 種類の滑膜肉腫細胞株 (SYO-1、YaFuSS)の感受性が、DNA 相同組み換え修復活性が低下した GM 細胞と同程度であったことから (Fig. 3A and B)、滑膜肉腫細胞株においても DNA 相同組み換え修復経路に異常があることが予想された。そこで、滑膜肉腫細胞株において DNA 相同組み換え修復で働くタンパク質の DNA 損傷部位(二本鎖 DNA 切断部位)への集積を蛍光免疫染色により調べた。DNA 二本鎖切断は、まず MRN (MRE11-RAD50-NBS1)複合体によって感知され、ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated)が下流因子のリン酸化を行う。その後、MRE11、CtIP、EXO1 のエクソヌクレアーゼ活性によって二本鎖 DNA の切断末端の 5'側の一本鎖 DNA が削り込まれ、3'側が突出した一本鎖 DNA が作り出される。3'側が突出した一本鎖 DNA は replication protein A (RPA)複合体によって保護され、RAD51 と置き換わる。置き換わった RAD51 は、相同配列を利用して 3'側が突出した一本鎖 DNA を姉妹染色体 DNA にもぐり込ませ、姉妹染色体 DNA を鋳型として DNA polymerase によって DNA を合成する。合成された DNA は DNA ligase によって連結され二本鎖切断 DNA は修復される (Fig. 4)。そこで、DNA 相同組み換え修復反応を 3 つのステップ(前期、中期、終期)に分け、滑膜肉腫細胞株において DNA 相同組み換え修復反応のどのステップに異常があるのか検証を試みた。10 Gy の電離放射線を照射し、1 時間 DNA 切断修復を行わせた後細胞を固定し、DNA 相同組み換え修復に関与する因子の抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。まず、リン

酸化 H2AX (γ H2AX) 抗体による免疫染色によって 10 Gy の電離放射線照射によって二本鎖 DNA 切断が誘発されているのか検証したところ、細胞核内に緑色の γ H2AX タンパク質がドット状に集積(foci formation)しており、電離放射線照射によって全ての細胞に二本鎖 DNA 切断が誘発されていることがわかった(Fig. 5)。次に、二本鎖 DNA 切断部位への DNA 相同組み換え修復の開始因子である MRN 複合体の集積を、その構成因子である MRE11 タンパク質の抗体を用いた免疫染色によって調べた。その結果、GM 細胞では MRN 複合体を二本鎖 DNA 切断部位へ連れて行く NBS1 タンパク質が欠損しているため、二本鎖 DNA 切断部位への MRE11 タンパク質の集積はほとんど検出できなかった。しかし、2 種類の滑膜肉腫細胞株(SYO-1、YaFuSS)では、GM-NBS1 細胞と同程度の MRE11 タンパク質の集積(赤色)が確認できた(Fig. 5A)。この結果から、2 種類の滑膜肉腫細胞株(SYO-1、YaFuSS)では DNA 相同組み換え修復の初期反応に異常は見られないことがわかった。次に、DNA 相同組み換え修復の中期反応である一本鎖 DNA の産出が起きているのか確認するため、一本鎖 DNA に特異的に結合する RPA 複合体の構成因子 RPA32 に対するリン酸化抗体(pRPA32 抗体)を用いて、二本鎖 DNA 切断部位へのリン酸化 RPA32 タンパク質の集積を調べた。その結果、GM 細胞では一本鎖 DNA が産出されないため、二本鎖 DNA 切断部位へのリン酸化 RPA32 タンパク質の集積はほとんど検出できなかった。一方、2 種類の滑膜肉腫細胞株(SYO-1、YaFuSS)では GM-NBS1 細胞と同程度のリン酸化 RPA32 タンパク質の集積(赤色)が確認できた(Fig. 5B)。この結果から、2 種類の滑膜肉腫細胞株(SYO-1、YaFuSS)では、DNA 相同組み換え修復の中期反応での異常は見られないことが示唆された。最後に、DNA 相同組み換え修復の終期反応の中心的タンパク質である RAD51 タンパク質の二本鎖 DNA 切断部位の集積を調べたところ、2 種類の滑膜肉腫細胞株(SYO-1、YaFuSS)では二本鎖 DNA 切断部位への RAD51 タンパク質の集積(赤色)はほとんど検出できなかった(Fig. 5C)。この結果から、これらの 2 種類の滑膜肉腫細胞株(SYO-1、YaFuSS)では、DNA 相同組み換え修復の終期反応に異常があることがわかった。これらの解析結果を総合する

と、滑膜肉腫細胞株では RAD51 タンパク質が一本鎖 DNA 上に結合した RPA 複合体と入れ替わることが出来ないことが原因となり、滑膜肉腫細胞株の DNA 相同組み換え修復が低下している可能性が示唆された。

3.1.3. 滑膜肉腫細胞株は DNA 相同組み換え修復活性が低下している。

滑膜肉腫細胞株の DNA 相同組み換え修復が低下している可能性が示唆されたため、DR-GFP レポーターアッセイを用いて、滑膜肉腫細胞の DNA 相同組み換え効率を測定することを試みた。このアッセイを行うため、まず細胞のゲノム中の一か所に GFP の配列に途中でストップコドンが 2 つ入り、I-*SceI* という制限酵素が認識する配列 (5'-TAGGGATAACAGGGTAAT-3') に置換した配列 *SceGFP* の後方に正常な GFP の内側の配列 iGFP (internal GFP) を持った安定発現細胞株を樹立した。樹立した細胞株に対して、I-*SceI* を発現するプラスミドをトランスフェクションし I-*SceI* を発現させると、*SceGFP* の配列で二本鎖 DNA 切断が起こり、DNA 相同組み換え修復が正常に行われると後方に位置する iGFP の配列を鋳型として *SceGFP* 配列を修復するため、正常な GFP が発現するようになる³³(Fig. 6A)。DR-GFP レポーターアッセイは、このように GFP が発現するようになった細胞集団の割合を求めることで、DNA 相同組み換え修復効率を測定するアッセイ系である。それぞれの細胞株に I-*SceI* を発現するプラスミドをトランスフェクションし 4 日間培養を行い、GFP 陽性細胞をフローサイトメトリーにより測定した。その結果、GM-NBS1 細胞および GM 細胞ではそれぞれ 13% および 6% の GFP 陽性細胞が検出された。一方、2 種類の滑膜肉腫細胞株(SYO-1、YaFuSS)では 2% の GFP 陽性細胞が検出され、2 種類の滑膜肉腫細胞株の DNA 相同組み換え修復効率は GM-NBS1 細胞のおよそ 6 分の 1 に低下していることがわかった(Fig. 6B)。

3.1.4. PARP 阻害剤 Olaparib は滑膜肉腫細胞株の増殖抑制効果を示す。

PARP (poly-[ADP-ribose] polymerase)阻害剤は、家族性乳がんの原因遺伝子として発見された、BRCA1 や BRCA2 に変異が見られる卵巣がんや乳がんの治療薬として効果を示す分子標的薬である^{34, 35}。BRCA1 遺伝子や BRCA2 遺伝子に変異が見られる卵巣がんや乳がんでは、DNA 相同組み換え修復活性が低下していることが知られている。PARP は base excision repair (BER; 塩基除去修復)による single strand DNA break repair (一本鎖 DNA 切断修復)に関与しているため、PARP 阻害剤は細胞内に生じた一本鎖 DNA 切断部位の修復を阻害し、複製フォークを介して二本鎖 DNA 切断を誘発する。従って、PARP 阻害剤は細胞周期の S 期特異的に二本鎖 DNA 切断を誘発する。細胞周期の S 期に生じた二本鎖 DNA 切断は主に DNA 相同組み換え修復によって修復されることから、PARP 阻害剤は DNA 相同組み換え修復活性が低下した細胞特異的に細胞増殖抑制効果を示す。滑膜肉腫の臨床の現場で用いられている AI 療法の奏効率は高いものの、生存期間中央値を延長することはできておらず³¹、まだ改善の余地がある化学療法である。そこで、私は 2 種類の滑膜肉腫細胞株の DNA 相同組み換え修復効率は GM-NBS1 細胞のおよそ 6 分の 1 に低下していることを見出したので(Fig. 6B)、PARP 阻害剤である Olaparib が AI 療法よりも臨床的に有効な化学療法となりうるかを検証するため、まず Olaparib に対する滑膜肉腫細胞株の感受性をコロニーアッセイ法により測定した。その結果、Olaparib に対して DNA 相同組み換え修復が回復した GM-NBS1 細胞は抵抗性を示すのに対して、2 種類の滑膜肉腫細胞株 (SYO-1、YaFuSS)は DNA 相同組み換え修復活性が低下した GM 細胞と同程度に感受性を示すことがわかった(Fig. 7)。この解析から、Olaparib が滑膜肉腫の治療に応用できる可能性が示唆された。

3.1.5. アルキル化剤 Temozolomide は Olaparib の滑膜肉腫細胞株の増殖抑制効果を増強する。

抗がん剤として利用されているアルキル化剤は PARP タンパク質が関与している

BER(塩基除去修復)によって修復される一本鎖 DNA 切断を生じることから、PARP 阻害剤との併用が有効であることが知られている³⁶。そこで、滑膜肉腫に対しても PARP 阻害剤とアルキル化剤の併用が有効であるのか調べるため、まずアルキル化剤である Temozolomide (脳腫瘍やメラノーマに使用されている抗がん剤)単剤の滑膜肉腫細胞株の増殖抑制効果を調べた。その結果、Temozolomide の濃度を 100 μ M まで上げたが、2 種類の滑膜肉腫細胞株、GM 細胞および GM-NBS1 細胞に対してほとんど細胞増殖抑制効果は検出できなかった (Fig. 8A)。次に、Temozolomide と Olaparib の併用効果を調べたところ、GM 細胞と同様に滑膜肉腫細胞株において Temozolomide 濃度依存的に増殖抑制効果が見られたが、GM-NBS1 細胞に対してはほとんど細胞増殖抑制効果は検出できなかった (Fig. 8B and C)。この結果から、Olaparib と Temozolomide の併用が滑膜肉腫の治療に応用できる可能性が示唆された。

3.2.1 滑膜肉腫細胞株はプロテアソーム阻害剤である Bortezomib に対して感受性を示す。

Gu らは HeLa 細胞等において siRNA を用いた DNA 相同組み換え修復に関与する BRCA1 遺伝子の発現抑制はプロテアソーム阻害剤である Bortezomib に対して感受性を示すが、同じく DNA 相同組み換え修復に関与する BRCA2 遺伝子の発現抑制は Bortezomib に対して感受性を示さないことを報告した³⁷。この報告は、細胞の Bortezomib 感受性が DNA 相同組み換え修復活性低下によって引き起こされていることを示してはいないが、BRCA1 と関連する経路に障害がある細胞において Bortezomib による細胞増殖抑制効果が予想された。そこで、Bortezomib が滑膜肉腫細胞においても細胞増殖抑制阻害効果を示すのか検証を行った(以下の実験では上記論文で使用していた DNA 相同組み換え活性が正常な HeLa 細胞をコントロールとして用いた)。その結果、Bortezomib は濃度依存的に 2 種類の滑膜肉腫細胞株(SYO-1, YaFuSS)の増殖を抑えるが、HeLa 細胞の増殖抑制効果は低いこ

とがわかった(Fig. 9)。

また、Bortezomib はタンパク質の分解を阻害することから細胞内の多くの経路に影響を与えることが予想された。そこで、Bortezomib 添加によって影響を受ける遺伝子、あるいは遺伝子経路を探索するため、50%の細胞増殖抑制効果を示す(IC₅₀)の約 4 倍の濃度(16 nM)の Bortezomib を 2 種類の滑膜肉腫細胞株 (SYO-1, YaFuSS)に 4 時間作用させ、マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、Bortezomib 添加によって多くの遺伝子の発現が変化することがわかった(Table 4 and 5)。さらに、これら遺伝子発現解析の結果から、Bortezomib 添加によって変動する遺伝子経路を探索したところ、GDF15、CDKN1A(p21^{CDKN1A})や PLK3 など p53 経路が活性化されていることがわかった。しかし、PUMA や NOXA などのアポトーシスを誘導する遺伝子の発現の変化は見られなかった。なお、ここで用いた 2 種類の滑膜肉腫細胞株 (SYO-1, YaFuSS)の p53 に変異はないことがわかっていてる。

3.2.2 Bortezomib は細胞周期を G1 期で止める。

マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析から滑膜肉腫細胞株において Bortezomib の添加によって p53 の下流で働く p21 の発現上昇が見られたことから、Bortezomib は滑膜肉腫細胞株の細胞周期に影響を与えることが予想された。そこで、2 種類の滑膜肉腫細胞株 (SYO-1, YaFuSS)および HeLa 細胞に 3 種類の濃度(0 nM, 4 nM, 8 nM)の Bortezomib を添加し、24 時間後の DNA 量を測定した。フローサイトメトリーの解析から、Bortezomib の添加によって 2 種類の滑膜肉腫細胞株(SYO-1, YaFuSS)では S 期の細胞が減少し、G1 期の細胞が増加したが、HeLa 細胞では細胞周期の変動は観察されなかった(Fig. 10)。この結果から、Bortezomib は滑膜肉腫細胞株の細胞周期を G1 期で停止させる効果があることがわかった。

3.2.3 Bortezomibはp21のタンパク質を増加させることで細胞周期をG1期で止める。

次に、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析から p21 の mRNA の発現が上昇していたことから、Bortezomib 添加後 24 時間での p53 および p21 のタンパク質量を調べた。その結果、Bortezomib の添加によって 2 種類の滑膜肉腫細胞株(SYO-1, YaFuSS)では濃度依存的に p53 のタンパク質量の増加と共に p21 のタンパク質量の増加が見られたが、HeLa 細胞では p21 のタンパク質量の増加は観察されなかった(Fig. 11A)。HeLa 細胞では HPV (*Human papillomavirus*)の E6 タンパク質が p53 と結合してユビキチン化を促進し、分解されており basal level では p53 の活性が低く抑えられていることから、p21 のタンパク質量の増加は見られなかったことが考えられる。しかし、8 nM の Bortezomib を添加すると HeLa 細胞においても p53 のタンパク質が確認でき、Bortezomib による p53 の分解が抑制されていることがわかる。このことから、Bortezomib の濃度を高くすれば、HeLa 細胞においても滑膜肉腫と同様に p21 のタンパク質量の増加が観察されることが予想される。

また、p21 は細胞質および核に局在することが知られていることから、Bortezomib の添加によって増加した p21 の滑膜肉腫細胞株での局在を細胞免疫染色を用いて調べた。その結果、滑膜肉腫細胞株 SYO-1 細胞では Bortezomib の添加前では p21 (赤色)は細胞質あるいは核に殆ど観察されなかったが、Bortezomib 添加によって p21 (赤色)は核に観察された(Fig. 11B)。この結果から、Bortezomib 添加は滑膜肉腫細胞株の核内に p21 を増加させる効果があることがわかった。

p21 は核内では Cyclin D-CDK4/6 の Rb タンパク質リン酸化活性を抑制することが知られている。そこで、Bortezomib 添加後 24 時間でのリン酸化 Rb のタンパク質量を調べた。その結果、Bortezomib の添加によって 2 種類の滑膜肉腫細胞株(SYO-1, YaFuSS)ではリン酸化 Rb のタンパク質量の減少が見られた(Fig. 12)。この結果から、滑膜肉腫細胞株において、Bortezomib 添加は細胞周期の G1 期から S 期への進行を促す Rb タンパク質のリン酸化を抑える効果があることがわかった。Rb タンパク質は G1 期では転写因子 E2F と結合し

て E2F の転写活性を抑制している。S 期へと移行する際に Rb タンパク質はリン酸化され、E2F から解離する。Rb タンパク質が解離した E2F は転写を活性化し、S 期で働く複数の遺伝子の発現を高めることが知られている(Fig. 13)。そこで、Bortezomib 添加後 24 時間での 4 種類の E2F 下流遺伝子(E2F1, E2F2, Cyclin A2, Cyclin E2)の mRNA 量を qRT-PCR により解析した。その結果、Bortezomib の添加によって 2 種類の滑膜肉腫細胞株(SYO-1, YaFuSS)では E2F 下流遺伝子 4 種類全ての発現量の減少が見られたが、HeLa 細胞では発現量の低下は見られなかった(Fig. 14)。この結果から、滑膜肉腫細胞株において、Bortezomib 添加は E2F の転写活性を抑制する効果があることがわかった。これらの結果を総合すると、滑膜肉腫細胞株において、Bortezomib 添加は核内に p21 を増加させることによりリン酸化 Rb を減少させ、転写因子 E2F の活性抑制を促すことで細胞周期を G1 期に停止することがわかった。

3.2.4 滑膜肉腫細胞株における E2F1 の発現減少は細胞増殖を抑制する。

複数の癌細胞において E2F1 の発現量を抑制すると細胞増殖能が抑制されることが報告されている^{38, 39}。そこで、Bortezomib 添加による E2F1 の mRNA 量の低下が滑膜肉腫細胞株の増殖抑制に働いているのかを調べるため、2 種類の siRNA を用いて E2F1 の発現量をノックダウンすることによる細胞増殖への影響を解析した。その結果、滑膜肉腫細胞株 SYO-1 細胞において E2F1-siRNA によるノックダウンによって細胞の増殖が抑制されることがわかった(Fig. 15)。この結果から、滑膜肉腫細胞株において、Bortezomib 添加は E2F1 の発現量を減少させることで細胞増殖を抑制する効果があることがわかった。

第4章 考察

4.1.1 滑膜肉腫細胞株は DNA 相同組み換え修復に異常がある。

滑膜肉腫由来の培養細胞株を用いた解析から、滑膜肉腫細胞株は DNA 相同組み換え修復終期において、一本鎖 DNA に結合した RPA 複合体が RAD51 に置き換わる過程に障害があることが原因で、DNA 相同組み換え修復活性が低下していることがわかった(Fig. 5B and C, Fig. 6B)。しかし、解析している滑膜肉腫由来の培養細胞株が 2 種類と少ないことから、これら細胞株が滑膜肉腫細胞の性質を代表しているのかわからない点が大きな問題である。この点を解決するには、滑膜肉腫由来の培養細胞株において DNA 相同組み換え修復活性が低下している原因を突き止め、その原因が滑膜肉腫組織にも見られるのか検証を行う必要がある。そこで、滑膜肉腫と DNA 相同組み換え修復活性低下と関連が予想される論文を探索したところ複数の論文を見出した。滑膜肉腫は 18 番染色体上の SS18 遺伝子と X 染色体上の SSX 遺伝子の転座によって引き起こされる肉腫であり、この転座によって生じる SS18-SSX 融合タンパク質は SWI/SNF (BAF) 複合体の構成因子 BAF47 の分解に働くこと、さらに、滑膜肉腫の手術組織の 92%(36 例中 33 例)において BAF47 の発現低下が認められることが報告されている^{30,40}。また、BAF47 遺伝子の欠失によりゲノム不安定性が誘発され、多倍体を引き起こすことが報告されている⁴¹。そこで、滑膜肉腫細胞株の DNA 量および染色体を調べたところ、滑膜肉腫細胞株において多倍体の存在が見つかり、endoreplication を起こしている染色体が確認できた(Fig. 9)。これらの解析結果から、滑膜肉腫細胞株においても BAF47 タンパク質の不安定化がゲノム不安定性を誘発している可能性が示唆された。

さらに、Klochendler-Yeivin らは BAF47 遺伝子のノックアウト MEF (mouse embryonic fibroblast) が DNA 損傷に対して感受性を示すようになることを報告している⁴²。また、近年、SWI/SNF (BAF) 複合体が DNA 相同組み換え修復に関与しているという報告が複数な

されている^{43, 44}。また、SWI/SNF (BAF)複合体の構成因子 Brg1 遺伝子のノックアウト細胞において SWI/SNF (BAF)複合体が RAD52 と相互作用できなくなることで、一本鎖 DNA に結合した RPA 複合体が RAD51 に置き換わる過程に障害が現れることが報告されている⁴⁴。これらの報告から、滑膜肉腫細胞で発現している SS18-SSX 融合タンパク質が BAF47 の不安定化を介して SWI/SNF (BAF)複合体の機能不全を誘発し、DNA 相同組み換え修復活性の低下を引き起こしている可能性が考えられる。今後、SS18-SSX 融合タンパク質が滑膜肉腫細胞の DNA 相同組み換え修復活性低下を引き起こすか検証を行う予定である。

4.1.2 PARP 阻害剤 Olaparib とアルキル化剤 Temozolomide の併用は滑膜肉腫に対して有効な化学療法となりうる。

滑膜肉腫患者の 5 年生存率は 60%を超えるものの、肺や脳への転移が頻繁に見られ、転移が起こった患者では 5 年生存率が 10%未満と非常に低くなっている^{45, 46}。滑膜肉腫の治療法として臨床で用いられている AI 療法は、細胞複製(DNA 複製)を介した二本鎖 DNA 切断を誘発する。AI 療法は正常細胞に比べてがん細胞の細胞増殖が活発であることを利用したものであるため、正常細胞でも細胞増殖が活発な骨髄細胞や毛根細胞等に作用してしまい副作用が頻繁に現れ、長期の治療が困難な場合が少なくない。最近、DNA 相同組み換え修復活性が低下した卵巣がんや乳がんに対して、分子標的薬である Olaparib (PARP 阻害剤の一つ)が効果を示すことが報告されている。Olaparib は DNA 相同組み換え修復活性が低下していない正常細胞には殆ど効果を示さないことから、副作用が比較的軽減されていることも報告されている。したがって、滑膜肉腫細胞において DNA 相同組み換え修復活性が低下していることが判れば、AI 療法に替えて Olaparib 投与も治療方法の一つとして有力になることが予想される。本研究で、私は DR-GFP 法を用いて DNA 相同組み換え修復活性を定量的に測定したところ、滑膜肉腫由来の 2 つの培養細胞株は DNA 相同組み換え修復活性が非常に低下していることを見出した(Fig. 6B)。さらに、これら滑膜肉腫由来の 2 つの

培養細胞株は Olaparib 単剤に対して高い感受性を示したことから(Fig. 7)、Olaparib が滑膜肉腫の治療に応用できる可能性が示された。

4.2.1 プロテアソーム阻害剤 Bortezomib は滑膜肉腫細胞株に対して p21 の蓄積により細胞周期を止めることで増殖を抑制する。

私は、滑膜肉腫細胞株は BRCA1 遺伝子発現抑制細胞と同様に抗がん剤 Bortezomib に感受性を示し、Bortezomib は滑膜肉腫の治療に応用できる可能性を見出した。滑膜肉腫細胞株が Bortezomib に感受性を示す分子経路を探索したところ、Bortezomib は p53 の分解を阻害することで滑膜肉腫細胞株の核内に p21 を増加させ、リン酸化 Rb を減少させた。その結果、転写因子 E2F の活性抑制を促し、細胞周期を G1 期に停止することで細胞増殖抑制効果を示すことがわかった。また、滑膜肉腫の手術組織の 18% (49 例中 9 例)にしか p53 の変異が見られないことが報告されており⁴⁷、Bortezomib を適応できる滑膜肉腫の患者の割合は多いことが考えられる。これまでに Bortezomib は BRCA1 遺伝子発現抑制細胞では 53BP1 によって細胞周期を G2/M 期で停止させると共にアポトーシスを誘導したり³⁵ 多発性骨髄腫においては、NF-κB の制御を介してアポトーシスを誘導したり⁴⁸ することで細胞増殖抑制効果を示すことが報告されている。これらの結果は、がん細胞の背景によって Bortezomib に感受性を示す分子経路は異なることが考えられる。

謝辞

本研究を行うにあたり、外部で研究を行う機会を与えて下さった東京大学医科学研究所クリニカルシーケンス分野の松田浩一教授、および聖マリアンナ医科大学大学院先端医療開発学の渡邊俊樹特任教授に深く御礼申し上げます。

また、本研究の全体の方針からその細部にいたるまで、日々暖かく熱心にご指導いただきました、国立がんセンター研究所創薬標的・シーズ評価部門ユニット長太田力博士に心から感謝を申し上げます。

様々なコメントや助言をいただきました、東京大学医科学研究所臨床ゲノム腫瘍学分野の古川洋一教授、細胞療法分野/幹細胞シグナル制御分野の合山進准教授、がん研究会がん化学療法センター所長藤田直也教授に深く御礼申し上げます。

研究に関することをはじめ、様々な助言を与えてくださった宮本麻美子博士と山本悠貴博士をはじめ国立がん研究センター研究所創薬標的・シーズ評価部門の方々に心から感謝を申し上げます。

最後に、研究生活を支えてくださった両親をはじめ、お世話になったすべての方々に感謝いたします。

参考文献

1. Nuno R. dos Santos, Diederik R.H. de Bruijn, and Ad Geurts van Kessel. (2001) Molecular Mechanisms Underlying Human Synovial Sarcoma Development. *Genes Chromosomes Cancer* 30: 1-14.
2. Marc Ladanyi, Cristina R. Antonescu, Denis H. Leung, James M. Woodruff, Akira Kawai, John H. Healey, Murray F. Brennan, Julia A. Bridge, James R. Neff, Frederic G. Barr, Jeffrey D. Goldsmith, John S. J. Brooks, John R. Goldblum, Syed Z. Ali, Janet Shipley, Colin S. Cooper, Cyril Fisher, Björn Skytting, and Olle Larsson. (2002) Impact of *SYT-SSX* Fusion Type on the Clinical Behavior of Synovial Sarcoma: A Multi-Institutional Retrospective Study of 243 Patients. *Cancer Res.* 62: 135-140.
3. Tatsuya Ishibe, Tomitaka Nakayama, Tomoki Aoyama, Takashi Nakamura, Junya Toguchida. (2008) Neuronal Differentiation of Synovial Sarcoma and Its Therapeutic Application. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 466: 2147-2155.
4. Malay Haldar, Jeffrey D. Hancock, Cheryl M. Coffin, Stephen L. Lessnick, Mario R. Capecchi. (2007) A Conditional Mouse Model of Synovial Sarcoma: Insights into a Myogenic Origin. *Cancer Cell* 11: 375-388.
5. CB Garcia, CM Shaffer, MP Alfaro, AL Smith, J Sun, Z Zhao, PP Young, MN VanSaun, JE Eid. (2012) Reprogramming of mesenchymal stem cells by the synovial sarcoma-associated oncogene *SYT-SSX2*. *Oncogene* 31: 2323-2334.
6. Jeremy Clark, Philippe J. Rocques, A. Jayne Crew, Sandra Gill, Janet Shipley, Andrew M. L. Chan, Barry A. Gusterson, Colin S. Cooper. (1994) Identification of novel genes, *SYT* and *SSX*, involved in the t(X;18)(p11.2;q11.2) translocation found in human synovial sarcoma. *Nat Genet* 7:502-508.
7. Iyad Sultan, Carlos Rodriguez-Galindo, Raya Saab, Sameer Yasir, Michela Casanova, Andrea Ferrari. (2009) Comparing children and adults with synovial sarcoma in the Surveillance, Epidemiology, and End Results program, 1983 to 2005: an analysis of 1268 patients. *Cancer* 115: 3537-3547.

8. Makoto Nagai, Shinya Tanaka, Masumi Tsuda, Shuichi Endo, Hiroyuki Kato, Hiroshi Sonobei, Akio Minam, Hiroaki Hiraga, Hiroshi Nishihara, Hirofumi Sawa, Kazuo Nagashima. (2001) Analysis of transforming activity of human synovial sarcoma-associated chimeric protein SYT-SSX1 bound to chromatin remodeling factor hBRMyhSNF2a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 3843-3848.

9. A. Jayne Crew, Jeremy Clark, Cyril Fisher, Sandra Gill, Robert Grimer, Aarti Chand, Janet Shipleyl, Barry A.Gusterson, Colin S.Cooper. (1995) Fusion of SYT to two genes, SSX1 and SSX2, encoding proteins with homology to the Kruppel-associated box in human synovial sarcoma. *EMBO J* 14: 2333-2340.

10. Michiko Ishida , Shinya Tanaka, Misao Ohki, Tsutomu Ohta. (2004) Transcriptional co-activator activity of SYT is negatively regulated by BRM and Brg1. *Genes Cells* 9: 419-428.

11. DRH. de Bruijn, NR dos Santos, J Thijssen, M Balemans, S Debernardi, B Linder, BD Young, A Geurts van Kessel. (2001) The synovial sarcoma associated protein SYT interacts with the acute leukemia associated protein AF10. *Oncogene* 20: 3281-3289.

12. Josiane E. Eid, Andrew L. Kung, Ralph Scully, David M. Livingston. (2000) p300 Interacts with the Nuclear Proto-Oncoprotein SYT as Part of the Active Control of Cell Adhesion. *Cell* 102, 839-848.

13. Tatsuo Ito, Mamoru Ouchida, Sachio Ito, Yoshimi Jitsumori, Yuki Morimoto, Toshifumi Ozaki, Akira Kawai, Hajime Inoue and Kenji Shimizu. (2004) SYT, a partner of SYT-SSX oncoprotein in synovial sarcomas, interacts with mSin3A, a component of histone deacetylase complex. *Lab. Invest.* 84: 1484-1490.

14. Taichi Kimura, Mieko Sakai, Kouichi Tabu, Lei Wang, Ryosuke Tsunematsu, Masumi Tsuda, Hirofumi Sawa, Kazuo Nagashima, Hiroshi Nishihara, Shigetsugu Hatakeyama, Keiko Nakayama, Marc Ladanyi, Shinya Tanaka, Keiichi I Nakayama. (2009) Human synovial sarcoma proto-oncogene Syt is essential for early embryonic development through the regulation of cell migration. *Lab. Invest.* 89: 645-656.

15. Garth Cronwright, Katarina Le Blanc, Cecilia Götherström, Pádraig Darcy, Monika Ehnman, Bertha Brodin. (2005) Cancer/Testis Antigen Expression in Human Mesenchymal Stem Cells: Down-regulation of SSX Impairs Cell Migration and Matrix Metalloproteinase 2 Expression. *Cancer Res.* 65: 2207-2215.
16. Özlem Türeci, Yao-Tseng Chen, Ugur Sahin, Ali O. Güre, Carsten Zwick, Carlos Villena, Solam Tsang, Gerhard Seitz, Lloyd J. Old, Michael Pfreundschuh. (1998) Expression Of *Ssx* Genes In Human Tumors. *Int. J. Cancer* 77: 19-23.
17. Fei Ling Lim, Marielle Soulez, Dirk Koczan, Hans-Jürgen Thiesen, Jennifer C. Knight. (1998) A KRAB-related domain and a novel transcription repression domain in proteins encoded by SSX genes that are disrupted in human sarcomas. *Oncogene* 17: 2013-2018.
18. Marielle Soulez, Andrew J. Saurin, Paul S. Freemont, Jennifer C. Knight. (1999) SSX and the synovial-sarcoma-specific chimaeric protein SYT-SSX co-localize with the human Polycomb group complex. *Oncogene* 18: 2739-2746.
19. DRH de Bruijn, AHA van Dijk, MP Willemsse, A Geurts van Kessel. (2008) The C terminus of the synovial sarcoma-associated SSX proteins interacts with the LIM homeobox protein LHX4. *Oncogene* 27: 653-662.
20. Michiko Ishida, Mamiko Miyamoto, Sayu Naitoh, Daisuke Tatsuda, Tadashi Hasegawa, Takeshi Nemoto, Hiroo Yokozeki, Kiyoshi Nishioka, Akio Matsukage, Misao Ohki, Tsutomu Ohta. (2007) The SYT-SSX Fusion Protein Down-Regulates the Cell Proliferation Regulator COM1 in t(x;18) Synovial Sarcoma. *Mol. Cell Biol.* 27: 1348-1355.
21. Satoshi Nagayama, Toyomasa Katagiri, Tatsuhiko Tsunoda, Taisuke Hosaka, Yasuaki Nakashima, Nobuhito Araki, Katsuyuki Kusuzaki, Tomitaka Nakayama, Tadao Tsuboyama, Takashi Nakamura, Masayuki Imamura, Yusuke Nakamura, Junya Toguchida. (2002) Genome-wide Analysis of Gene Expression in Synovial Sarcomas Using a cDNA Microarray. *Cancer Res.* 62: 5859-5866.
22. Yuntao Xie, Björn Skytting, Gunnar Nilsson, Alessandra Gasbarri, Karl Haslam,

- Armando Bartolazzi, Bertha Brodin, Nils Mandahl, Olle Larsson. (2002) *SYT-SSX* Is Critical for Cyclin D1 Expression in Synovial Sarcoma Cells: A Gain of Function of the t(X;18)(p11.2;q11.2) Translocation. *Cancer Res.* 62: 3861-3867.
23. Satoshi Nagayama, Chikako Fukukawa, Toyomasa Katagiri, Takeshi Okamoto, Tomoki Aoyama, Naoki Oyaizu, Masayuki Imamura, Junya Toguchida, Yusuke Nakamura. (2005) Therapeutic potential of antibodies against FZD10, a cell-surface protein, for synovial sarcomas. *Oncogene* 24: 6201-6212.
24. Diederik R.H. de Bruijn, Susanne V. Allander, Anke H.A. van Dijk, Marieke P. Willemse, Jose Thijssen, Jan J.M. van Groningen, Paul S. Meltzer, Ad Geurts van Kessel. (2006) The Synovial Sarcoma–Associated SS18-SSX2 Fusion Protein Induces Epigenetic Gene (De)Regulation. *Cancer Res.* 66: 9474-9482.
25. N Friedrichs, J K uchler, E Endl, A Koch, J Czerwitzki, P Wurst, D Metzger, JH Schulte, MI Holst, LC Heukamp, O Larsson, S Tanaka, A Kawai, E Wardelmann, R Buettner, T Pietsch, W Hartmann. (2008) Insulin-like growth factor-1 receptor acts as a growth regulator in synovial sarcoma. *J. Pathol.* 216: 428-439.
26. L Su, H Cheng, AV Sampaio, TO Nielsen, TM Underhill. (2010) EGR1 reactivation by histone deacetylase inhibitors promotes synovial sarcoma cell death through the PTEN tumor suppressor. *Oncogene* 29: 4352-4361.
27. Sebastian Michels, Marcel Trautmann, Elisabeth Sievers, Dagmar Kindler, Sebastian Huss, Marcus Renner, Nicolaus Friedrichs, Jutta Kirfel, Susanne Steiner, Elmar Endl, Peter Wurst, Lukas Heukamp, Roland Penzel, Olle Larsson, Akira Kawai, Shinya Tanaka, Hiroshi Sonobe, Peter Schirmacher, Gunhild Mechttersheimer, Eva Wardelmann, Reinhard B uttner, Wolfgang Hartmann. (2013) SRC Signaling Is Crucial in the Growth of Synovial Sarcoma Cells. *Cancer Res.* 73: 2518-2528.
28. M Trautmann, E Sievers, S Aretz, D Kindler, S Michels, N Friedrichs, M Renner, J Kirfel, S Steiner, S Huss, A Koch, R Penzel, O Larsson, A Kawai, S Tanaka, H Sonobe, A Waha, P Schirmacher, G Mechttersheimer, E Wardelmann, R B uttner, W Hartmann. (2014) SS18-SSX fusion protein-induced Wnt/ β -catenin signaling is a therapeutic target in synovial sarcoma. *Oncogene* 33: 5006-5016.

29. Le Su, Arthur V. Sampaio, Kevin B. Jones, Marina Pacheco, Angela Goytain, Shujun Lin, Neal Poulin, Lin Yi, Fabio M. Rossi, Juergen Kast, Mario R. Capecchi, T. Michael Underhill, Torsten O. Nielsen. (2012) Deconstruction of the SS18-SSX Fusion Oncoprotein Complex: Insights into Disease Etiology and Therapeutics. *Cancer Cell* 21: 333-347.

30. Cigall Kadoch, Gerald R. Crabtree. (2013) Reversible Disruption of mSWI/SNF (BAF) Complexes by the SS18-SSX Oncogenic Fusion in Synovial Sarcoma. *Cell* 153: 71-85.

31. M. Van Glabbeke, A. T. van Oosterom, J. W. Oosteruhs, H. Mouriden, D Crowther, R. Somers, J. Verweij, A. Santoro, J. Buesa, and T. Tursz. (1999) Prognostic Factors for the Outcome of Chemotherapy in Advanced Soft Tissue Sarcoma: An Analysis of 2,185 Patients Treated With Anthracyclin-Containing First-Line Regimens-A European Organization for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group Study. *J Clin Oncol.* 17: 150-157.

32. Yuki Yamamoto, Mamiko Miyamoto, Daisuke Tatsuda, Michiaki Kubo, Hitoshi Nakagama, Yusuke Nakamura, Hitoshi Sato, Koichi Matsuda, Toshiki Watanabe, and Tsutomu Ohta. (2014) A Rare Polymorphic Variant of *NBS1* Reduces DNA Repair Activity and Elevates Chromosomal Instability. *Cancer Res.* 74: 3707-3715.

33. Andrwe J. Pierce, Roger D. Johnson, Larry H. Thompson, and Maria Jasin. (1999) XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes Dev.* 13: 2633-2638.

34. Helen E. Bryant, Niklas Schultz, Huw D. Thomas, Kayan M. Parker, Dan Flower, Elena Lopez, Suzanne Kyle, Mark Meuth, Nicola J. Curtin and Thomas Helleday. (2005) Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 434: 913-917.

35. Hannah Farmer, Nuala McCabe, Christopher J. Lord, Andrew N. J. Tutt, Damian A. Johnson, Tobias B. Richardson, Manuela Santarosa, Krystyna J. Dillon, Ian Hickson, Charlotte Knights, Niall M. B. Martin, Stephen P. Jackson, Graeme C. M. Smith and Alan Ashworth. (2005) Targeting the DNA repair defect in *BRCA*

mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* **434**: 917-921.

36. Junko Murai, Yiping Zhang, Joel Morris, Jiuping Ji, Shunichi Takeda, James H. Doroshow and Yves Pommier. (2014) Rationale for Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Inhibitors in Combination Therapy with Camptothecins or Temozolomide Based on PARP Trapping versus Catalytic Inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* **349**: 408-416.
37. Y Gu, P Bouwman, D Greco, J Saarela, B Yadav, J Jounkers and SG Kuznetsov. (2014) Suppression of BRCA1 sensitizes cells to proteasome inhibitors. *Cell Death Dis.* **5**: e1580.
38. S Pandolfim V Montagnani, A Lapucci and B Stecca. (2015) HEDGEHOG/GLI-E2F1 axis modulates iASPP expression and function and regulates melanoma cell growth. *Cell Death Dis.* **22**: 2006-2019.
39. Sin-Aye Park, James Platt, Jong Woo Lee, Francesc Lopez-Giraldez, Roy S. Herbst, and Ja Seok Koo. (2015) E2F8 as a Novel Therapeutic Target for Lung Cancer. *J Natl Cancer Inst.* **107**: djv151.
40. Junko Ito, Naofumi Asano, Akira Kawai, Akihiko Yoshida. (2016) The diagnostic utility of reduced immunohistochemical expression of SMARCB1 in synovial sarcomas: a validation study. *Hum Pathol.* **47**: 32-37.
41. Robert G. J. Vries, Vladimir Bezrookove, Lobke M. P. Zuijderduijn, Sima Kheradmand Kia, Ada Houweling, Igor Oruetxebarria, Anton K. Raap, and C. Peter Verrijzer. (2005) Cancer-associated mutations in chromatin remodeler hSNF5 promote chromosomal instability by compromising the mitotic checkpoint. *Genes Dev.* **19**: 665-670.
42. Agnes Klochendler-Yeivin, Eli Picarsky, and Moshe Yaniv. (2006) Increased DNA Damage Sensitivity and Apoptosis in Cells Lacking the Snf5/Ini1 Subunit of the SWI/SNF Chromatin Remodeling Complex. *Mol. Cell. Biol.* **26**: 2661-2674.
43. Reiko Watanabe, Ayako Ui, Shin-ichiro Kanno, Hideaki Ogiwara, Takahiro Nagase, Takashi Kohno, and Akira Yasui. (2014) SWI/SNF Factors Required for Cellular

Resistance to DNA Damage Include ARID1A and ARID1B and Show Interdependent Protein Stability. *Cancer Res.* 74: 2465-2475.

44. Wenjing Qi, Ruoxi Wang, Hongyu Chen, Xiaolin Wang, Ting Xiao, Istvan Boldogh, Xueqing Ba, Liping Han, and Xianlu Zeng. (2015) BRG1 promotes the repair of DNA double-strand breaks by facilitating the replacement of RPA with RAD51. *J. Cell Sci.* 128: 317-330.
45. Satoshi Takenaka, Takafumi Ueda, Norifumi Naka, Nobuhito Araki, Nobuyuki Hashimoto, Akira Myoui, Toshifumi Ozaki, Tomitaka Nakayama, Junya Toguchida, Kazuhiro Tanaka, Yukihide Iwamoto, Akihiko Matsumine, Atsumasa Uchida, Makoto Ieguchi, Mitsunori Kaya, Takuro Wada, Ichiro Baba, Ikuo Kudawara, Yasuaki Aoki, Hideki Yoshikawa. (2008) Prognostic implication of SYT-SSX fusion type in synovial sarcoma: A multi-institutional retrospective analysis in Japan. *Oncol. Rep.* 19: 467-476.
46. Emanuela Palmerini, Eric L. Staals, Marco Alberghini, Licciana Zanella, Cristina Ferrari, Maria Serena Banassi, Piero Picci, Mario Mercuri, Gaetano Bacci, and Sefano Ferrari. (2009) Synovial Sarcoma. *Cancer* 115: 2988-2998.
47. Yoshinao Oda, Akio Sakamoto, Tsuyoshi Satio, Sigeto Kawauchi, Yukihiko Iwamoto, and Masazumi Tsuneyoshi. (2000) Molecular Abnormalities of p53, MDM2, and H-ras in Synovial Sarcoma. *Mod Pathol* 13: 994-1004.
48. Robert Z. Orlowski and Albert S. Baldwin, Jr. (2002) NF- κ B as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol Med.* 8: 385-389.

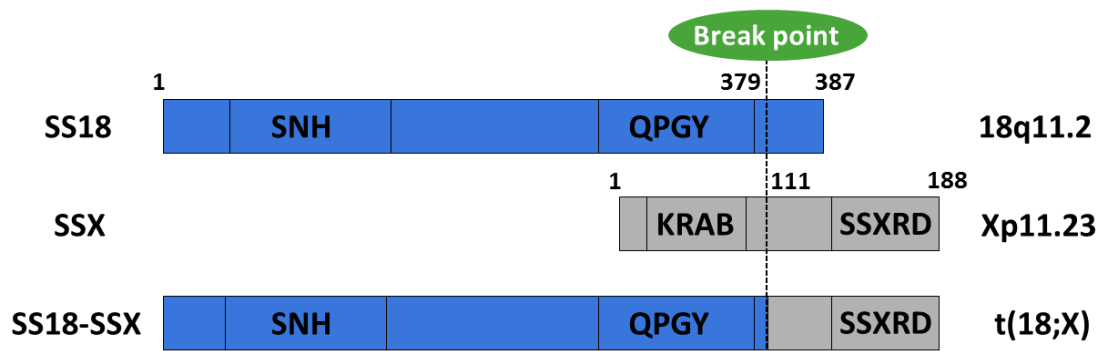


Figure 1. SS18 遺伝子と SSX 遺伝子の染色体転座

Table 1. Gene expression profiles: genes down-regulated by SS18-SSX1

Gene	Accession no.	Signal intensity		Ratio ^a
		Vector	SYT-SSX1	
BAX	NM_004324	7,587	1,459	0.192
B4GALT1	NM_001497	18,152	4,746	0.261
CHOP	NM_004083	4,183	510	0.122
COM1	NM_012385	2,968	237	0.080
ORP150	NM_006389	17,324	5,326	0.307
PLAB	NM_004864	11,376	1,718	0.151

^a Signal intensity of SYT-SSX1/signal intensity of vector.

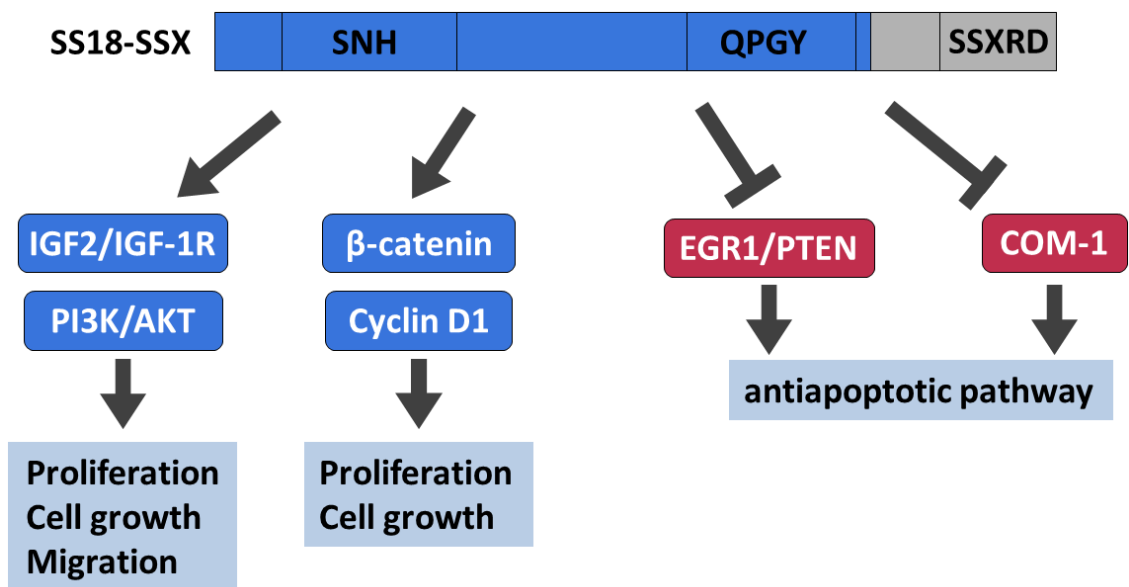


Figure 2. 融合遺伝子 SS18-SSX の滑膜肉腫発症における影響

Table 2. Therapeutic Regimens (Table 1 in reference 31).

Regimen	Cycle Description	Cycle Duration (weeks)
A	Adriamycin, 75 mg/m ²	3
B	Adriamycin, 50 mg/m ² Ifosfamide, 5 g/m ²	3
C	Adriamycin, 50 mg/m ² Ifosfamide, 5 g/m ² G-CSF	3
D	Epirubicin, 75 mg/m ²	3
E	Epirubicin, 150 mg/m ²	3
F	Epirubicin, 50 mg/m ² , days 1-3	3
G	Adriamycin, 50 mg/m ² Dacarbazine, 250mg/m ² , days 1-5 Cyclophosphamide, 500mg/m ² Vincristine, 1.5 g/m ²	4
H	Adriamycin, 50 mg/m ² Dacarbazine, 250mg/m ² , days 1-5 Cyclophosphamide, 500mg/m ² , day 29 Vincristine, 1.5 g/m ² , day 29	8
I	Adriamycin, 50 mg/m ² Dacarbazine, 750mg/m ² Cyclophosphamide, 500mg/m ² Vincristine, 1.5 g/m ²	3

Abbreviation: G-CSF, granulocyte-colony stimulating factor.

Table 3. Results of Previous Studies (Table 2 in reference 31).

Study No.	Treat. Arm*	No. of Cases	No. of Survivors	No. of Responders	Response Rate (%)	Median Survival Time (weeks)	<i>P</i>
62861	G	191	184	151	34	44	.001†; .422‡
	H	121	118	93	15	42	
62801	A	106	101	85	25	41	.277†; .622‡
	D	104	102	84	18	46	
62842	B	203	195	177	34	58	
62851	A	295	289	266	23	49	.437†; .896‡
	B	297	287	254	28	57	
	I	157	157	146	27	51	
62883	C	111	111	99	46	54	
62901	A	112	111	99	13	50	.705†; .967‡
	E	111	109	97	16	48	
	F	111	109	93	17	45	
62903	B	157	155	145	23	55	.491†; .919‡
	C	157	157	143	26	49	
Total		2233	2185	1922	26	51	

Abbreviation: Treat. Arm, treatment arm.

*See Table 1 for details regarding the treatment arms.

†*P* value for response rate.

‡*P* value for survival time.

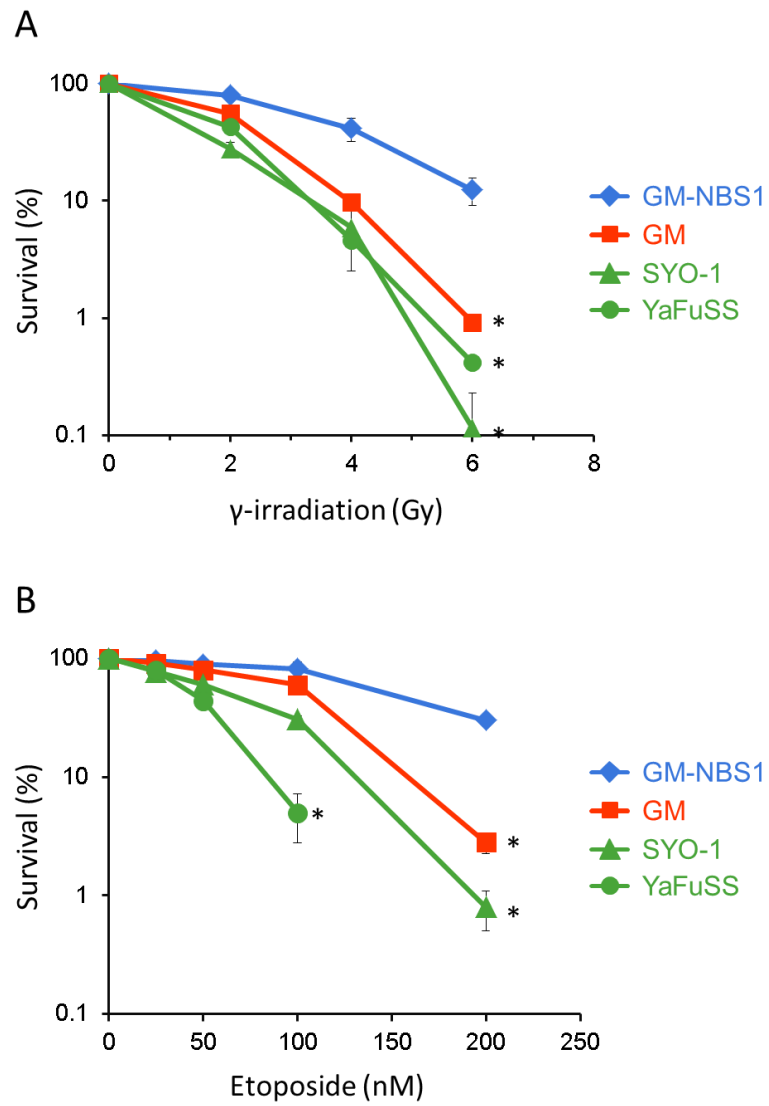


Figure 3. 滑膜肉腫細胞株における DNA 損傷修復が低下している。

(A, B) 滑膜肉腫細胞株および GM-NBS1、GM 細胞のコロニーアッセイによる生存曲線。電離放射線 0, 2, 4, 6 Gy 照射後(A) Etoposide 0, 25, 50, 100, 200nM (B) (*)は $p < 0.01$ を示す。データは平均±SEM ($n = 3$)を示した。

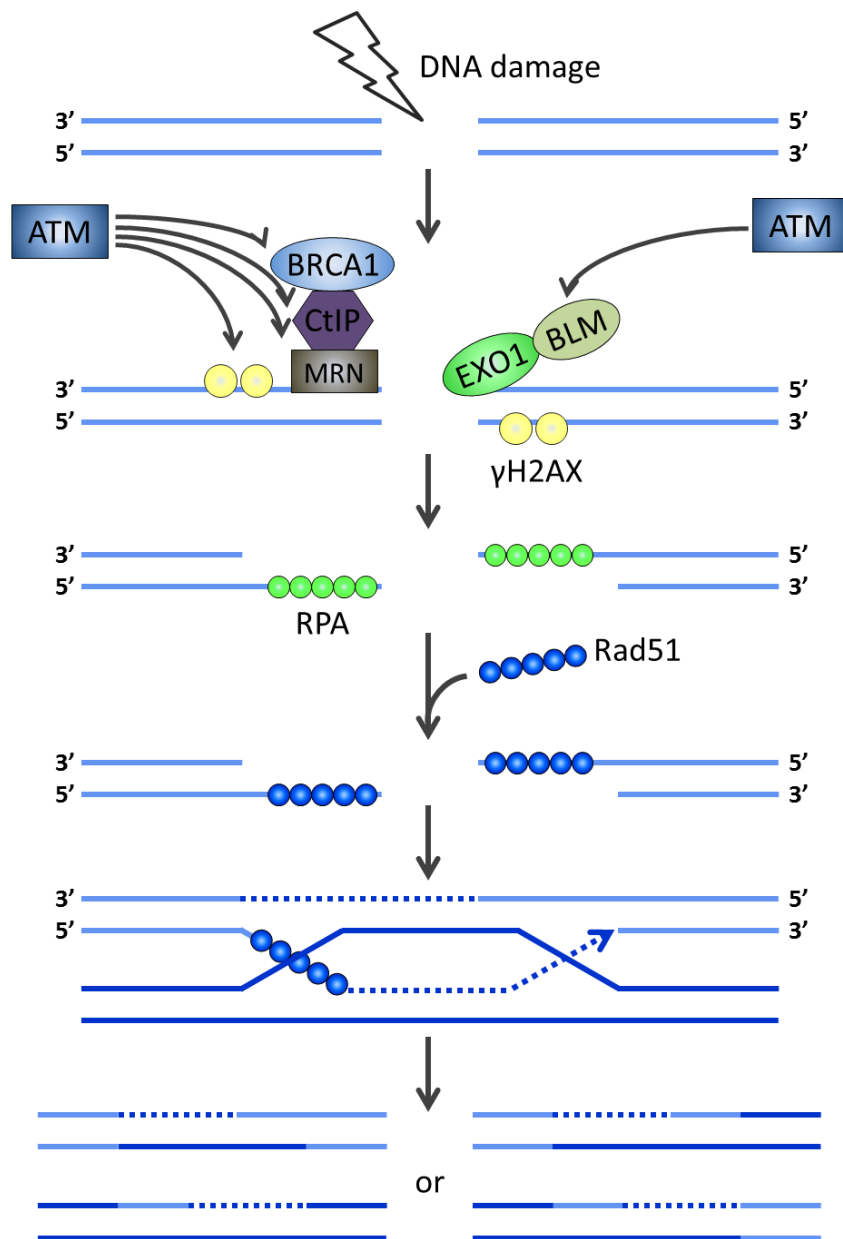
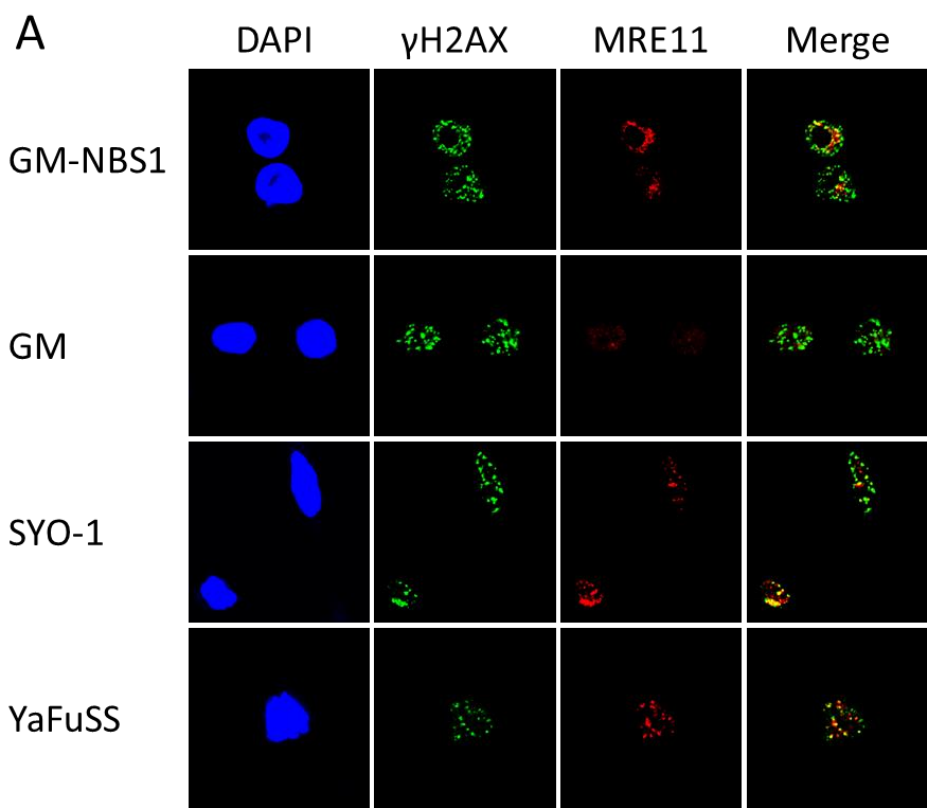
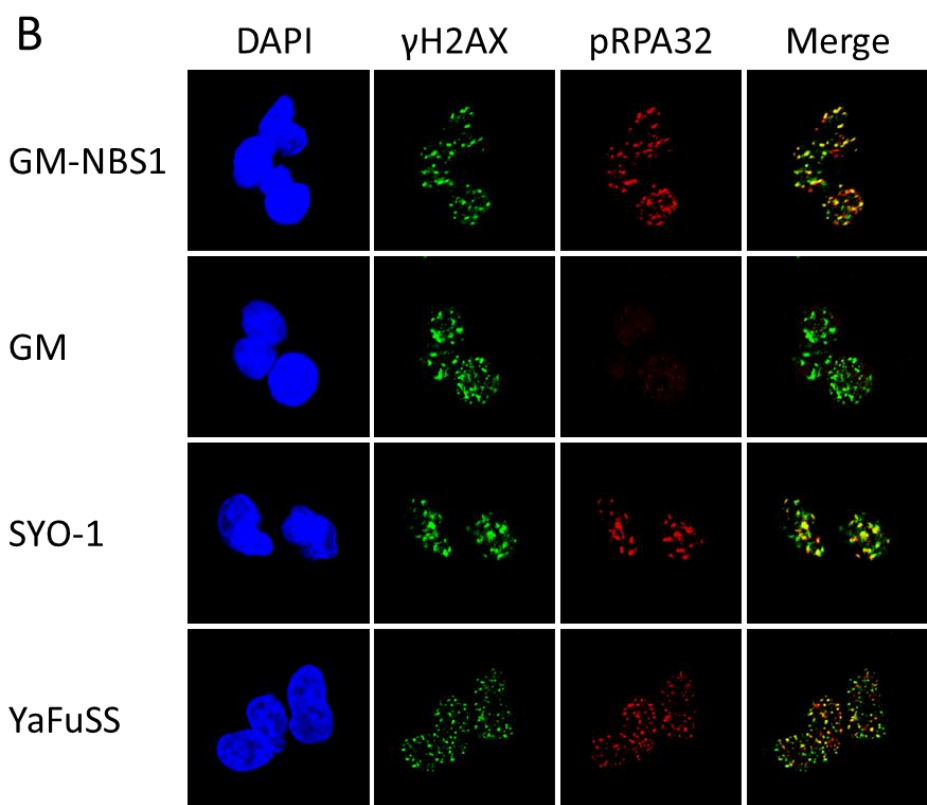


Figure 4. DNA 相同組み換え修復経路

複製ストレスや紫外線によるストレスにより生じた DNA 損傷は MRN (MRE11-RAD50-NBS1)複合体によって認識され、ATM や ATR といった下流のキナーゼを活性化する。これらのキナーゼによりリン酸化された DNA 修復因子が γ H2AX を目印としてリクルートされる。Mre11、CtIP、EXO1 により DNA の end resection が行われ、3'末端のオーバーハングが生じる。この一本鎖 DNA は、RPA(replication protein A)によって保護され、その後 RAD51 と置き換わる。Rad51 はフィラメント状に一本鎖 DNA を覆い保護し、姉妹染色体の相同する配列を検索し、もぐりこんでいく。もぐりこんだ 3'末端は DNA ポリメラーゼによって伸長され、修復される。





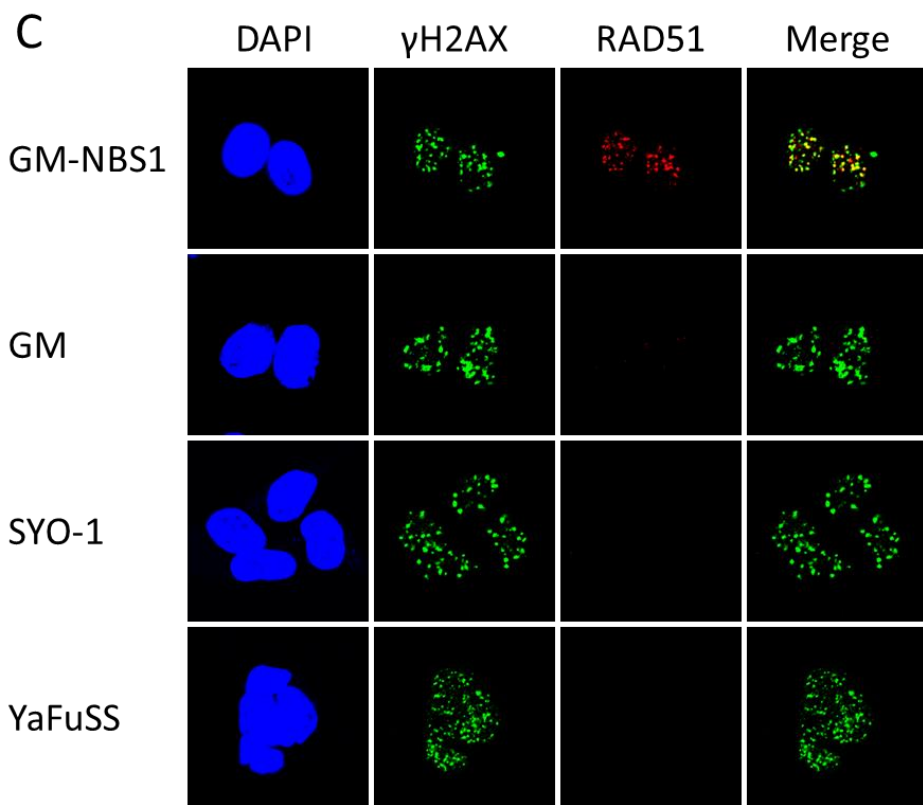


Figure 5. 滑膜肉腫細胞株は DNA 相同組み換え修復の終期反応に異常がある。
 (A, B and C) γ H2AX および MRE11 の foci formation. 10Gy の電離放射線照射後 1 時間 (A)
 γ H2AX および pRPA32 の foci formation. 10Gy の電離放射線照射後 2 時間 (B) γ H2AX
 および RAD51 の foci formation. 10Gy の電離放射線照射後 4 時間 (C)

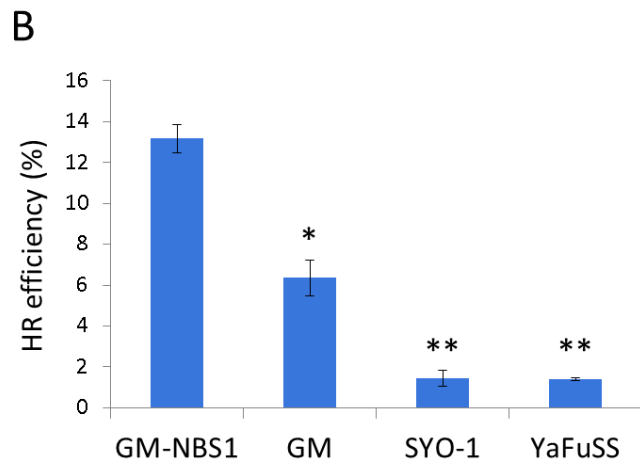
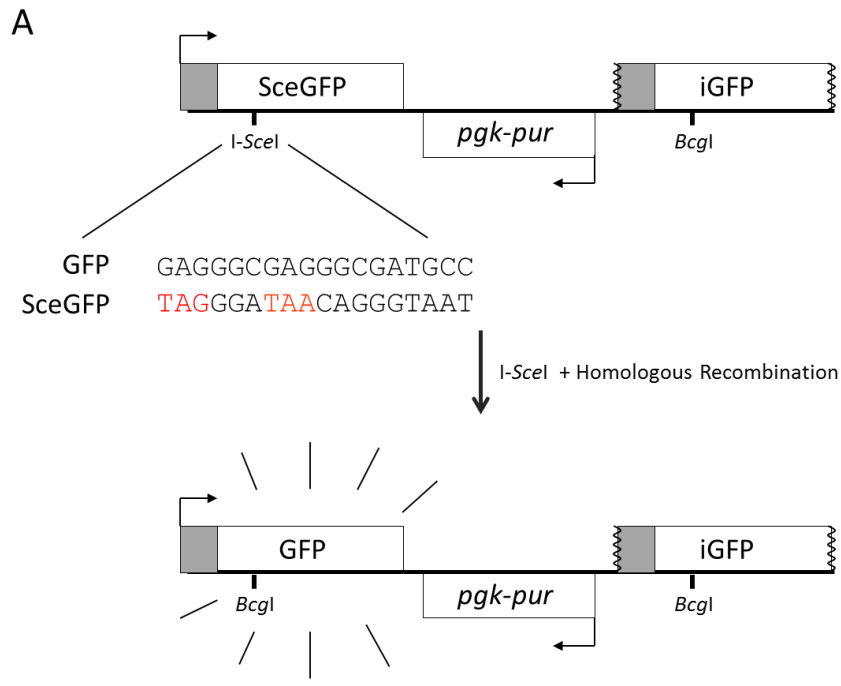


Figure 6. 滑膜肉腫細胞株は DNA 相同組み換え修復活性が低下している。

(A) DR-GFP レポーターアッセイのスキーム図

(B) DR-GFP レポーターアッセイ。I-SceI プラスミドをトランスフェクション後、4 日間培養し、フローサイトメトリーにより GFP 陽性細胞をカウントした。(*)は $p < 0.05$ 、(**)は $p < 0.01$ を示す。データは平均 \pm SEM ($n = 3$)を示した。

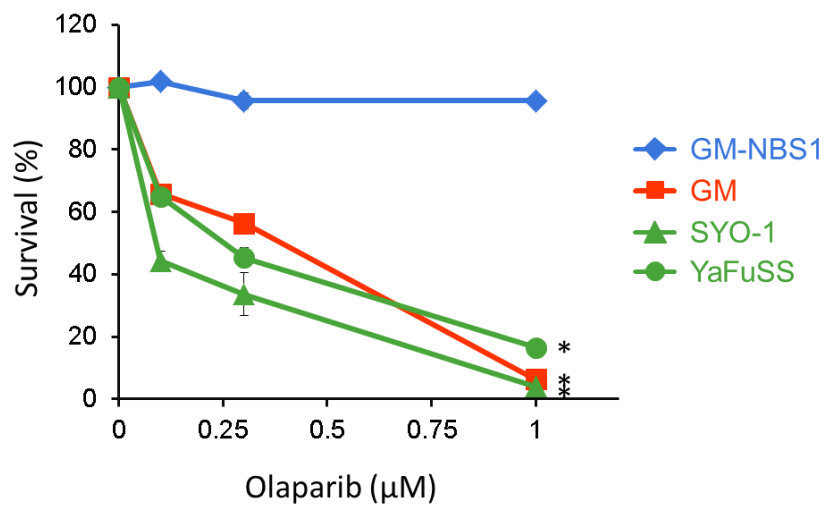


Figure 7. PARP 阻害剤 Olaparib は滑膜肉腫細胞株の増殖抑制効果を示す。

Olaparib 0, 0.1, 0.3, 1μM 存在下での滑膜肉腫細胞株および GM-NBS1, GM 細胞のコロニーアッセイによる生存曲線。(*)は $p < 0.01$ を示す。データは平均 \pm SEM ($n = 3$)を示した。

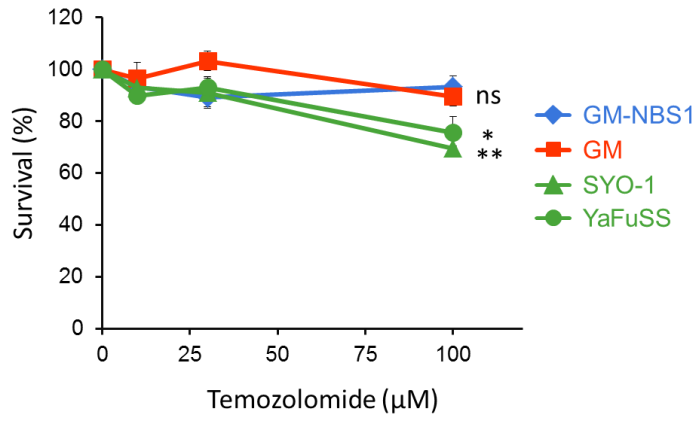
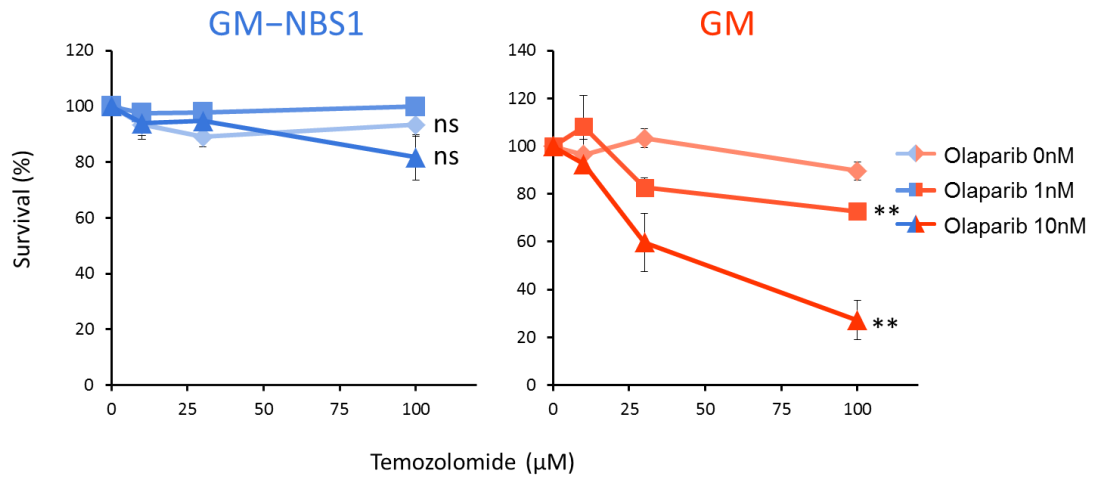
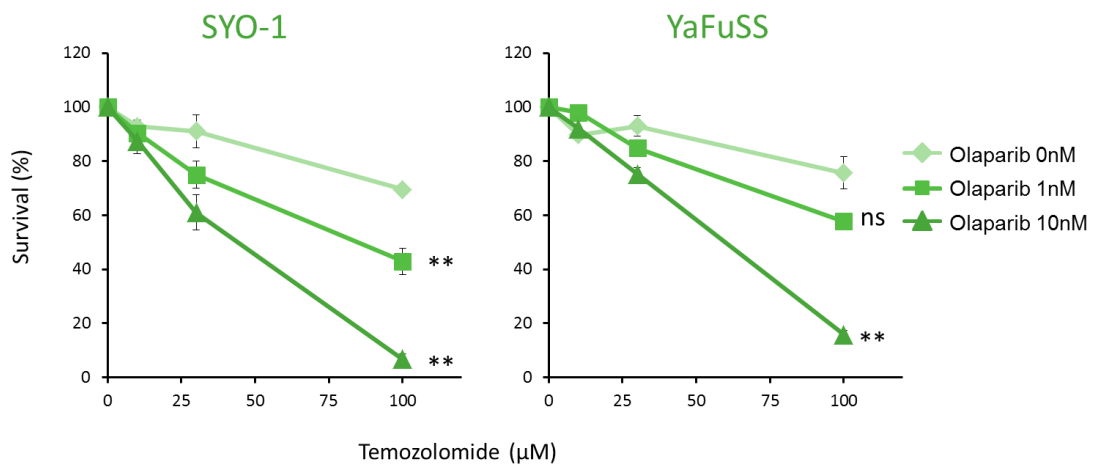
A**B****C**

Figure 8. アルキル化剤 Temozolomide は Olaparib の滑膜肉腫細胞株の増殖抑制効果を増強する。

- (A) Temozolomide 0, 10, 30, 100 μM 存在下での滑膜肉腫細胞株および GM-NBS1, GM 細胞のコロニーアッセイによる生存曲線。データは平均 \pm SEM ($n = 3$)を示した。(ns)は not significant を、(*)は $p < 0.05$ を、(**)は $p < 0.01$ 示す。
- (B) GM-NBS1, GM 細胞に対する Olaparib 0, 1, 10nM と Temozolomide 0, 10, 30, 100 μM 併用時のコロニーアッセイによる生存曲線。(ns)は not significant を、(**)は $p < 0.01$ を示す。データは平均 \pm SEM ($n = 3$)を示した。
- (C) 滑膜肉腫細胞株 SYO-1, YaFuSS に対する Olaparib 0, 1, 10nM と Temozolomide 0, 10, 30, 100 μM 併用時のコロニーアッセイによる生存曲線。(ns)は not significant を、(**)は $p < 0.01$ を示す。データは平均 \pm SEM ($n = 3$)を示した。

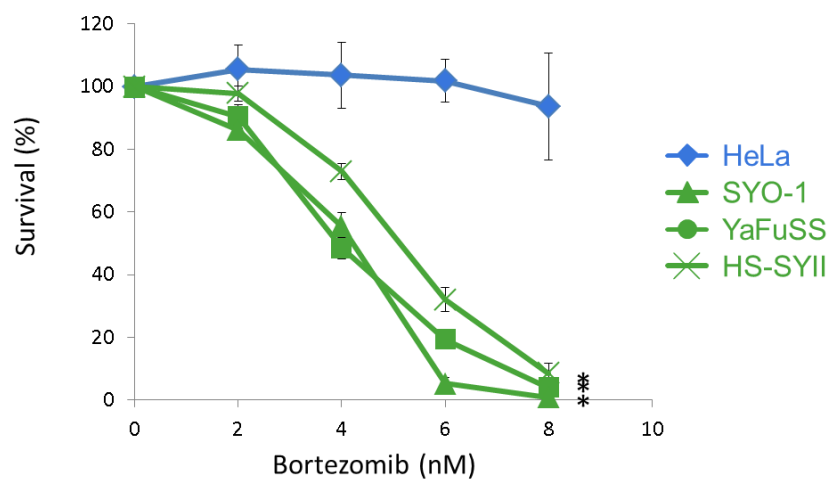


Figure 9. 滑膜肉腫細胞株は Bortezomib に対して感受性を示す。
 各濃度の Bortezomib 添加後 48 時間培養し、生存していた細胞数をカウントし、DMSO コントロールの細胞数で標準化を行った。(*)は $p < 0.01$ を示す。データは平均 \pm SEM ($n = 3$) を示した。

Table 4. Gene expression profiles: genes up-regulated by Bortezomib

		SYO-1	YaFuSS
GDF15	NM_004864	21.88049	12.26375
PVRL4	NM_030916	8.70874	3.10129
CDKN1A	NM_078467	7.43843	3.98530
FOSL1	NM_005438	5.60136	3.33706
PLK3	NM_004073	4.58082	8.64686

Table 5. Gene expression profiles: genes down-regulated by Bortezomib

		SYO-1	YaFuSS
DDIT3	NM_004083	-11.74071	-2.18020
SLC35E3	ENST00000399333	-5.82641	-2.45551
TLR9	NM_017442	-4.88908	-2.24071
CHAC1	NM_024111	-4.75774	-19.27754
TAS2R10	NM_023921	-3.72388	-7.50066

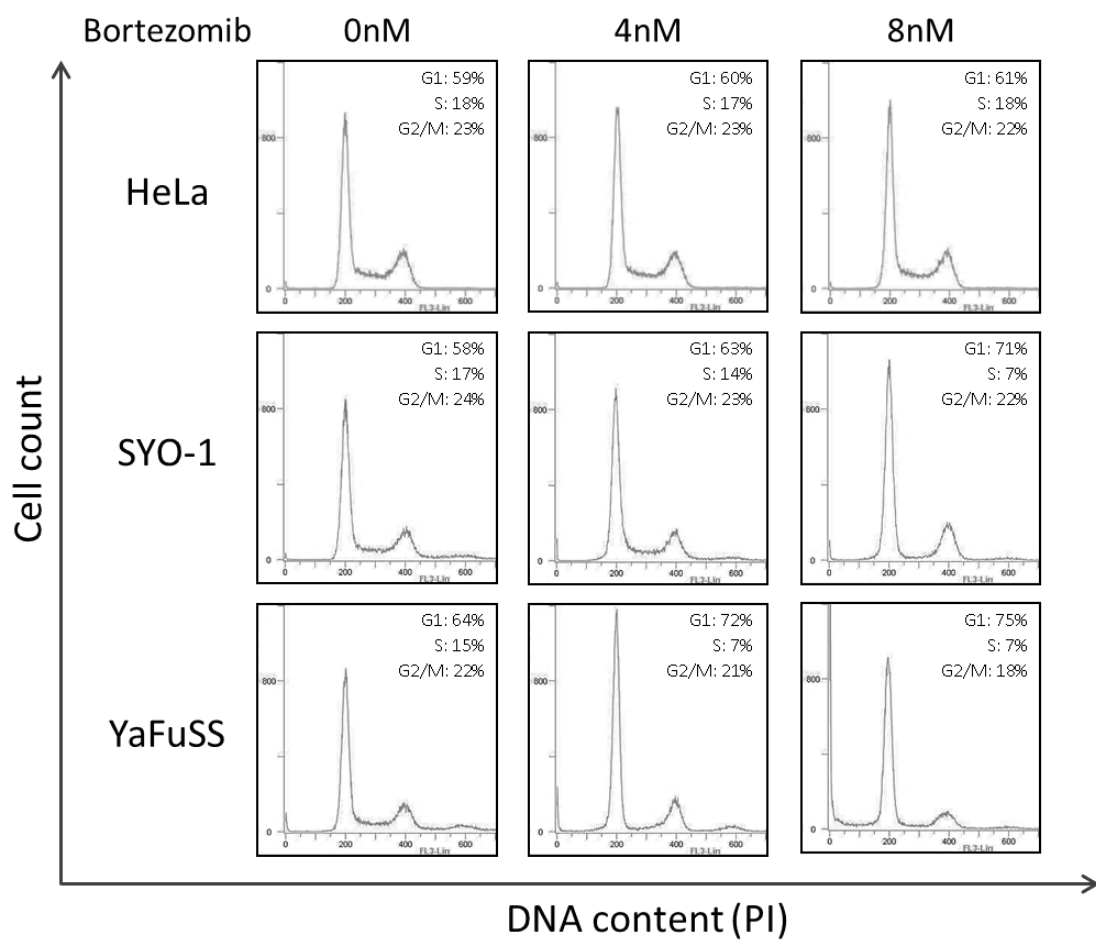
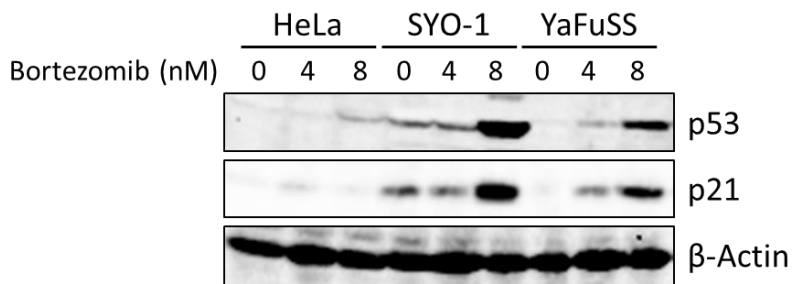


Figure 10. Bortezomib は滑膜肉腫細胞株の細胞周期を G1 期で止める。
 Bortezomib を 0nM, 4nM, 8nM 添加後 24 時間培養し、DNA を Propidium Iodide (PI) で染色し、フローサイトメトリーにより細胞周期を解析した。

A



B

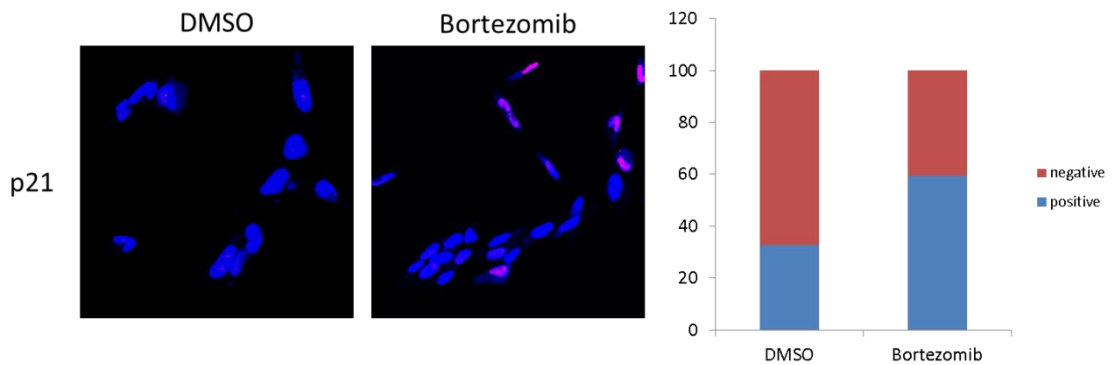


Figure 11. Bortezomib は p21 の蛋白質量を増加させる。

(A) Bortezomib 0 nM, 4 nM, 8 nM 添加後 24 時間での p21 蛋白質のウェスタンブロット。

(B) Bortezomib 4 nM 添加後 24 時間での SYO-1 細胞における p21 の核内の蓄積。DAPI(青色)および p21(赤色)。左側に p21 に対する免疫蛍光細胞染色を示す。右側に p21 陽性細胞の割合のグラフを示す。

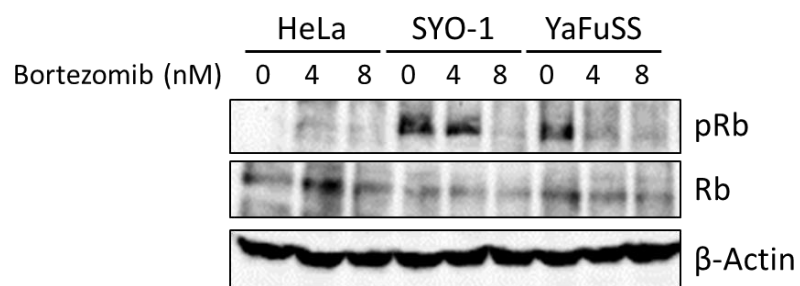


Figure 12. Bortezomib は Rb タンパク質のリン酸化を抑える。
 Bortezomib 0 nM, 4 nM, 8 nM 添加後 24 時間での phospho-Rb (pRb)タンパク質および Rb
 タンパク質のウェスタンブロット。

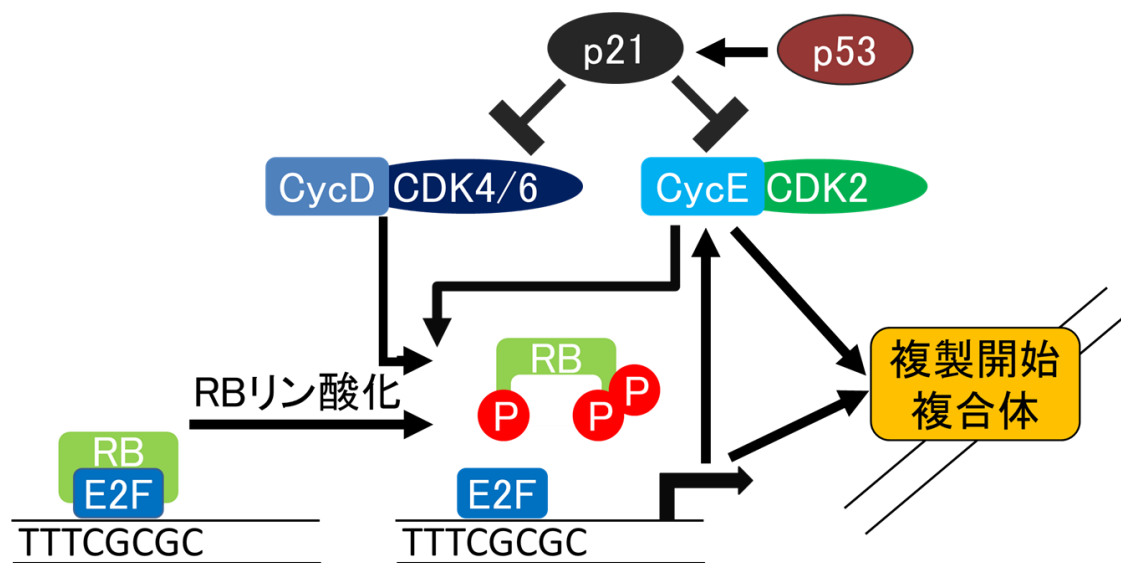


Figure 13. E2F は G1 期から S 期への移行を促進させる。

G1 期から S 期への移行では、Cyclin D-CDK4/6 複合体および Cyclin E-CDK2 複合体が制御している。増殖シグナルを受けて Cyclin D が合成され、CDK4/6 と結合すると、Rb タンパク質をリン酸化する。リン酸化した Rb タンパク質は、E2F と結合することができなくなり、転写因子 E2F は Rb タンパク質から離れ、Cyclin E や DNA 複製に必要な遺伝子群などの発現を誘導する。G1 期に DNA 損傷などのストレスが起こった際には、p53 が ATM や ATR などの PI3 キナーゼによってリン酸化され、p21 の発現を誘導する。その後、p21 は Cyclin D-CDK4/6 複合体および Cyclin E-CDK2 複合体を阻害して、S 期への移行を抑制する。

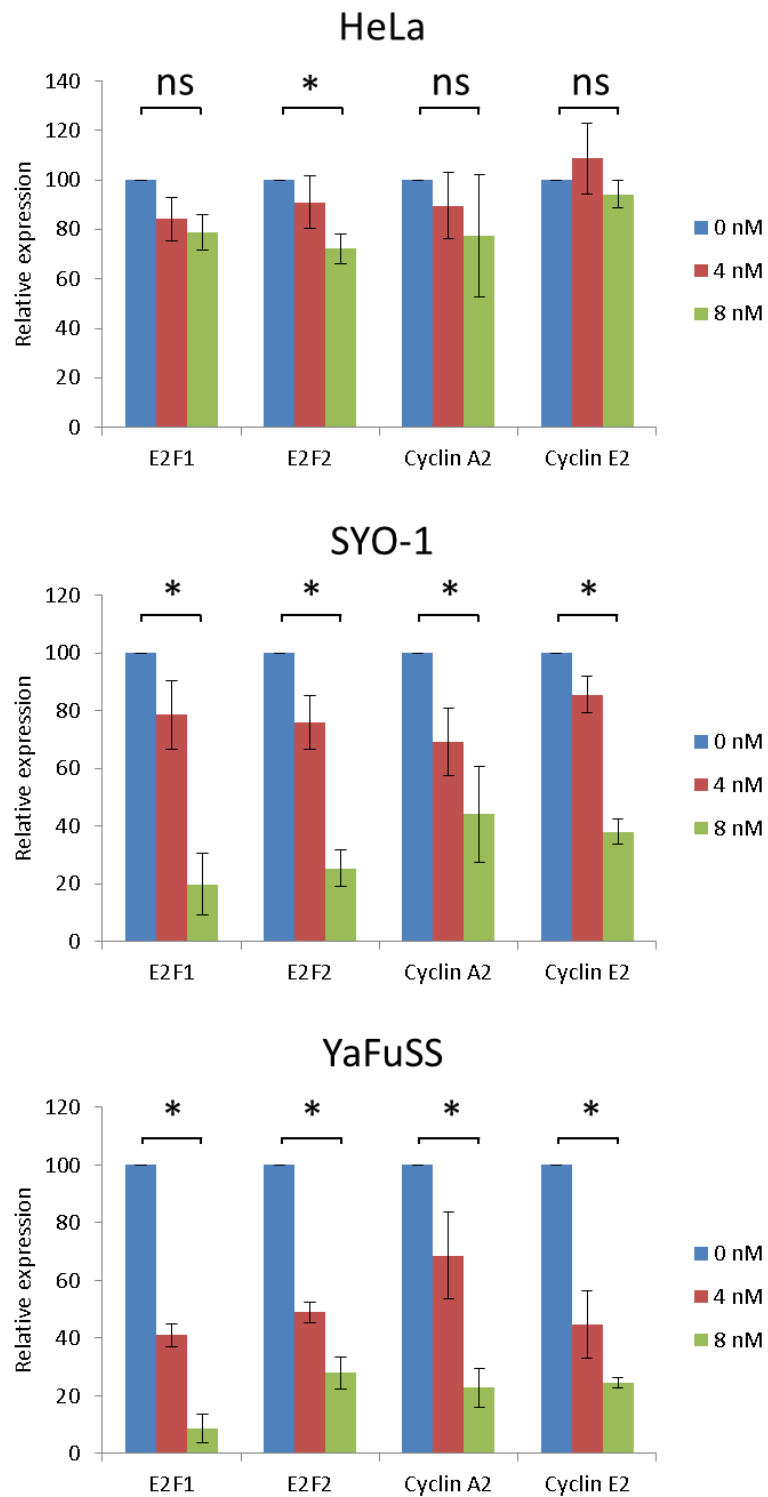


Figure 14. Bortezomib は E2F の下流遺伝子の発現を抑制する。Bortezomib 0 nM, 4 nM, 8 nM 添加後 24 時間での E2F 下流遺伝子(E2F1, E2F2, Cyclin A2, Cyclin E2)の mRNA 量。(ns)は not significant を、(*)は $p < 0.01$ を示す。データは平均 \pm SEM ($n = 3$)を示した。

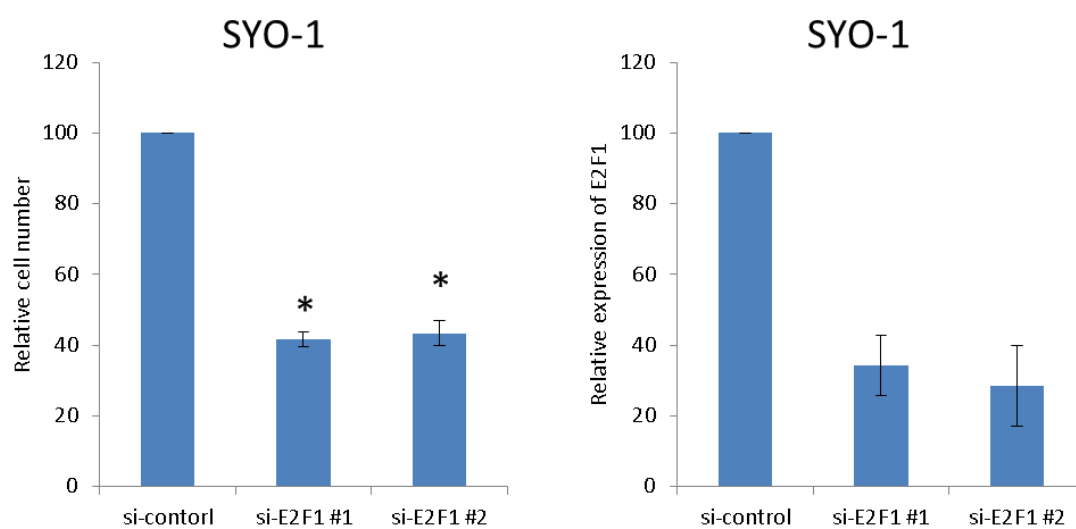
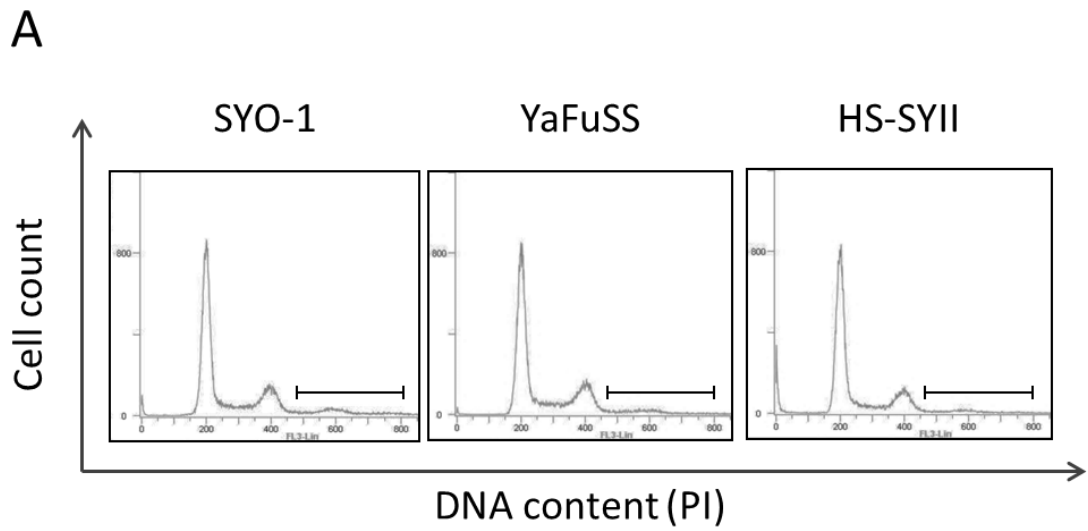


Figure 15. E2F1 の発現抑制は滑膜肉腫細胞株の増殖を抑える。

滑膜肉腫細胞株 SYO-1 に E2F1 に対する siRNA をエレクトロポレーションによりトランスフェクションし、24 時間後細胞を各サンプル 2×10^4 個ずつまき直し、さらに 48 時間培養後の細胞数をカウントし、コントロール siRNA の細胞数で標準化した。右側に E2F1 の mRNA 量を示す。 (*)は $p < 0.01$ を示す。データは平均 \pm SEM ($n = 3$)を示した。



B

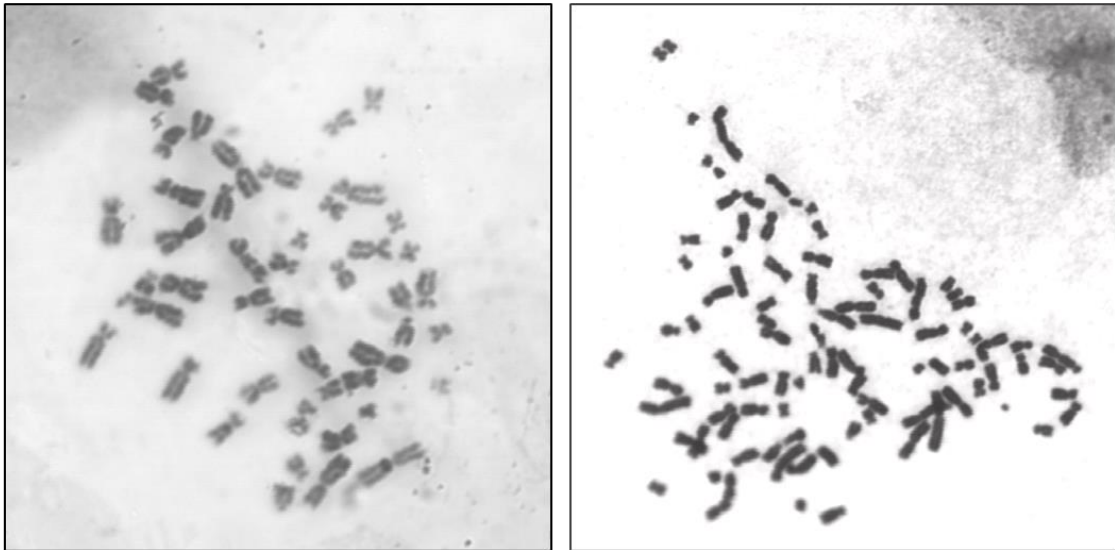


Figure 16. 滑膜肉腫細胞株は多倍体を有している。

(A) 滑膜肉腫細胞株 SYO-1, YaFuSS, HS-SYII の細胞周期

(B) 滑膜肉腫細胞株 SYO-1 のギムザ染色による 2N(左側)および 4N(右側)の染色体画像。